ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. V No 1 – 2

1 9 5 6

NSP
PAN
M M

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
23 OCT 1963

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej oraz referaty przeglądowe nigdzie dotychczas nie opublikowane.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja „*Acta Microbiologica Polonica*", Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują „Acta" bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 40,— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja „*Acta Microbiologica Polonica*", Wrocław, ul. Siemieńskiego 14, m. 8).

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. V No 1–2

1956
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek tytularny PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwice, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa.

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger

Sekretarz Redakcji — Natalia Balicka

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Nakład 1299 + 100 egz.	Oddano do składania 20. 4. 56 r.
Ark. wyd. 26,0; druk. 20,5	Podpisano do druku 27. 11. 56 r.
Papier bezdrz. III kl 80 g, 70 × 100	Druk ukończono w grudniu 56 r.
Cena zł 20.—	Nr zam. 546/56 F-7-2340

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

Z dniem 1 stycznia 1956 roku Redakcja Acta Microbiologica Polonica przeniesiona została do Wrocławia.

W związku z tym nastąpiła reorganizacja Komitetu Redakcyjnego. Ustąpił Sekretarz Naukowy Redakcji — lek. wet. Kazimierz Dygdała oraz Sekretarz Techniczny ob. Anna Fleszyńska.

Komitet korzysta ze sposobności aby podziękować lek. wet. Dygdale za trud i wysiłek, jakie włożył on w organizację czasopisma i w prowadzenie codziennej, żmudnej pracy redakcyjnej. Jednocześnie Komitet dziękuje ob. Fleszyńskiej za wzorowe prowadzenie administracyjno-technicznej pracy Redakcji i współudział w organizowaniu wymiany czasopisma.

Obowiązki Sekretarza Naukowego Redakcji objęła doc. dr Natalia Balicka, zaś Sekretarza Technicznego ob. Emma Hohenberg.

Zreorganizowany Komitet Redakcyjny dołoży wszelkich starań, aby zapewnić dalszy rozwój czasopisma.

KOMITET REDAKCYJNY

KOMUNIKAT

Komitetu Mikrobiologicznego przy Wydziale II (Nauk Biologicznych) Polskiej Akademii Nauk

Komisja Naukowa dla Spraw Kolekcji Drobnoustrojów przy Komitecie Mikrobiologicznym Polskiej Akademii Nauk zawiadamia, że Ośrodek Administracyjny Komisji rozpoczął pracę nad rejestracją typowych szczepów drobnoustrojów znajdujących się w placówkach naukowych na terenie Polski, ważnych dla potrzeb nauki i produkcji.

W związku z tym prosi się zainteresowane instytucje i osoby o zwracanie się we wszelkich sprawach związanych z kolekcjonerstwem szczepów drobnoustrojów (rejestracja szczepów posiadanych, wymiana szczepów w kraju i z zagranicą, określanie szczepów itp.) do Ośrodka Administracyjnego Komisji Naukowej dla Spraw Kolekcji Drobnoustrojów przy Komitecie Mikrobiologicznym Polskiej Akademii Nauk — Warszawa, ul. Chocimska 24 (Państwowy Zakład Higieny — Muzeum Szczepów, pokój nr 318).

PRACE XIII ZJAZDU MIKROBIOLOGÓW POLSKICH

Sekcja I. Morfologia i fizjologia drobnoustrojów
Sekcja II. Mikrobiologia gleby, wody, powietrza i ścieków
Sekcja III. Mikrobiologia przemysłowa i środków spożywczych

Poznań, dnia 25, 26 i 27 września 1955 r.

ТРУДЫ XIII СЪЕЗДА ПОЛЬСКОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА

Секция I. Морфология и физиология микроорганизмов
Секция II. Микробиология почвы, воды, воздуха и сточных вод
Секция III. Техническая и пищевая микробиология

Познань, 25, 26 и 27 сентября 1955 г.

PROCEEDINGS OF THE POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS

Section I. Morphology and physiology of microorganisms
Section II. Microbiology of soil, water, air and sewage
Section III. Industrial microbiology and microbiology of food

Poznań, 25, 26, and 27 September 1955.

Prace i doniesienia umieszczono zasadniczo w takiej formie, w jakiej otrzymały je Komitety Redakcyjne poszczególnych Sekcji i Komitet Redakcyjny „Acta Microbiologica Polonica".

SEKCJA — СЕКЦИЯ — SECTION

I

MORFOLOGIA I FIZJOLOGIA DROBNOUSTROJÓW

МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY OF MICROORGANISMS

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 9 - 14

A. Horoszewicz i *J. Horoszewicz*

OBSERWACJE NAD WPŁYWEM PENICYLINY I INNYCH ANTYBIOTYKÓW NA POSTACIE *L PROTEUS MIRABILIS*

Z Zakładu Bakteriologii Akademii Medycznej w Łodzi

Tematem doniesienia było przedstawienie własnych obserwacji nad otrzymywaniem i rozwojem form *L* u *Proteus mirabilis* oraz wpływem różnych czynników na te postacie.

W celu otrzymania kolonii *L* używane do badań szczepy *Proteus mirabilis 39* i *123* wysiewano na pożywkę Lewinthala zawierającą 1% agaru, 20% surowicy końskiej oraz penicylinę w stężeniu powyżej 100 j./ml. Niezmiernie ważne jest przy tym, by pożywka nie była zbyt twarda. Dodatek agaru w stężeniach powyżej 1,4 - 1,5% hamował tworzenie kolonii *L*. Surowicę, sączoną przez filtr Seitza, otrzymywano z odwłóknionej krwi końskiej. Stosowano penicylinę produkcji polskiej oraz duńskiej.

Używając penicylinę w stężeniach niższych (5 - 30 j./ml pożywki) obserwowaliśmy obok pałeczek normalnych pojawianie się form nitkowatych oraz postaci silnie rozdętych. Mikroskopowo wzrost miał charakter delikatnego nalotu, jaki zwykle obserwuje się w hodowlach odmieńca.

Jeżeli do podłoży dodawaliśmy penicylinę w ilości powyżej 100 j./ml, to po upływie 4 - 5 godzin nie dostrzegaliśmy już pałeczek normalnych, a na powierzchni pożywki znajdowały się wyłącznie postacie nitkowate oraz niezbyt liczne ciała kuliste. Stosując obserwacje ciągłe zauważono, że w niciach zjawiają się silnie łamiące światło ziarnistości barwy zielonej lub brunatnej (Fot. 1 Tabl. I — po str. 16). Ziarnistości te ciągle powiększają się, wywołując rozpad nici na fragmenty, stają się przejrzyste i tworzą ciałko kuliste. Proces ten odbywa się dość szybko, w ciągu 10 - 15 minut, i nie zawsze jest łatwy do uchwycenia.

Następnie w różnych miejscach pożywki pokrytej ciałami kulistymi powstają zgrupowania drobnych elementów ziarnistych drążących w głąb podłoża, określanych przez nas jako „skupienia wrastania". Stanowią one centrum, dookoła którego formuje się właściwa kolonia *L* (Fot. 2). Wszelkie czynniki, upośledzające tworzenie kolonii *L* hamują całkowicie rozwój „skupień wrastania". Szczególnie wyraźnie widać to na podłożach zbyt twardych, gdzie mimo obecności w dużych ilościach ciał kulistych nie pojawiają się zupełnie kolonie *L* ponieważ nie odbywa się wrastanie.

W ciągu 48 - 72 godzin od chwili wysiewu kolonie powiększają się i można je oglądać gołym okiem. Wyróżniliśmy wśród nich 3 zasadnicze typy:

Typ *A* — kolonie bardzo maleńkie, o średnicy poniżej 300 μ, składające się tylko jakby z zagęszczonego „centrum wrastania". Pojawiały się one najczęściej dopiero po upływie 60 - 70 godzin. Przesiewanie ich było możliwe tylko razem z kawałkiem podłoża, na którym rosły, bądź też wydłubując je w całości za pomocą spłaszczonego na końcu drucika (Fot. 3).

Typ *B* — kolonie nieco większe, dochodzące do 0,6 - 0,7 mm, z dużym „centrum wrastania" otoczonym szeroką strefą ciał kulistych (Fot. 4). Kolonie te rosły najobficiej ze wszystkich, będąc już po 24 godzinach wyraźnie widoczne. Można je było przesiewać łatwo zwykłym uszkiem; kolejne przesiewy dawały obfity wzrost. Używając odpowiednio dużego *inoculum* można było uzyskać wzrost w postaci zlewających się kolonii pokrywających całą powierzchnię pożywki.

Kolonie typu *B* pozostawione na płytce przez 8 - 10 dni w cieplarce, a nawet w temperaturze pokojowej, powiększają się nieco, a wreszcie zaczynają tracić swój charakterystyczny kształt. Wywołane jest to pojawieniem się dookoła kolonii obrąbka w postaci delikatnego nalotu mającego skłonność do pełzania po powierzchni pożywki. Mikroskopowo stwierdza się przeważnie pałeczki normalne i formy nitkowate. Mamy tu do czynienia z przejściem postaci *L* w postać bakteryjną pod wpływem spadku koncentracji penicyliny w pożywce. Opisywanego zjawiska nie obserwowaliśmy nigdy w odniesieniu do kolonii typu *A*.

Kolonie typu *B* przy rozcieraniu w wodzie bądź w roztworze fizjologicznym NaCl posiadają konsystencję śluzowatą, co utrudnia otrzymanie jednorodnej zawiesiny. Śluzowatość ta znika po podgrzaniu zawiesiny do około 60°.

Opisywany tu typ kolonii uzyskaliśmy także na zwykłej 1% pożywce agarowej z penicyliną, bez dodatku surowicy bądź innych czynników wzbogacających.

Kolonie typu *C* są wielkie, o średnicy dochodzącej do 2 mm, wysokie i silnie wrastające w głąb podłoża, tworzące obficie brunatny pigment w centrum kolonii (Fot. 5). Typ ten występuje najrzadziej. Całe kolonie oglądano na pożywkach pod lupą oraz pod małym powiększeniem mikroskopu. Wyraźne wyniki dawało także sporządzanie preparatów odciskowych, pozwalające na zastosowanie rozmaitych metod barwienia (Fot. 6). Preparaty takie najczęściej barwiliśmy mieszaniną błękitu metylenowego lub lazuru i wodnego roztworu fuksyny. Środek kolonii i część otaczających go ciał kulistych barwi się na ciemnogranatowo, zaś elementy leżące bardziej na obwodzie barwią się na kolor czerwony. Podobnie metoda Giemsy pozwala wyróżnić w kolonii słabo barwiący się pas obwodowy i dobrze wybarwione centrum. Sudan IV szczególnie silnie barwi część wrastającą w podłoże, co wskazuje na większą zawartość w niej ciał lipoidowych.

W przyżyciowych obserwacjach drobnoustrojów tworzących kolonie *L* korzystaliśmy z preparatów barwionych zielenią Janusową, czerwienią obojętną lub lazurem.

Użycie ciemnego pola widzenia pozwalało dostrzegać w stanie żywym najdrobniejsze jednostki kolonii *L*, tzw. ciałka elementarne o średnicy 0,20 - 0,25 μ, których główna masa jest zgrupowana w samym centrum kolonii i wrasta w pożywkę. To zagęszczone centrum jest ośrodkiem wzrostu i regeneracji kolonii. Przemawia za tym fakt, że jeżeli zeskrobać

lub wydłubać kolonię z pożywki stałej, to po 24 godzinach w tym samym miejscu pojawia się kolonia podobnie wykształcona. Zabieg ten można powtarzać 4 - 5 razy, zawsze z podobnym skutkiem. Obserwację tę wykorzystaliśmy do sporządzenia większych ilości zawiesiny form *L* do aglutynacji bądź też do uodporniania zwierząt.

Uzyskaliśmy surowice odpornościowe skierowane przeciwko szczepowi wyjściowemu oraz przeciwko formom *L*. Do uodporniania używaliśmy zawiesiny drobnoustrojów zabitych w temperaturze 56° w ciągu 40 min. Surowica otrzymana na drodze dożylnych wstrzykiwań królikowi komórek szczepu wyjściowego *Proteus 123* aglutynowała zarówno szczep wyjściowy, jak i formy *L* z niego powstałe do miana 1/3200.

Przy uzyskiwaniu surowic skierowanych przeciwko formom *L* napotykaliśmy na trudność polegającą na tym, że wprowadzenie dożylne zawiesiny form *L* wywołuje zator w płucach i śmierć zwierzęcia. Musieliśmy się więc uciec do uodporniania podskórnego i dootrzewnowego świnki morskiej, otrzymując w ten sposób surowicę aglutynującą postacie *L* do miana 1/640. Surowica ta aglutynowała również formy bakteryjne w tym samym rozcieńczeniu.

We wszystkich wypadkach udawało się z form *L* otrzymać w ciągu 12 - 18 godzin postacie wyjściowe po przesianiu na pożywki nie zawierające penicyliny.

Dalsze badania ześrodkowały się na obserwacjach wpływu na formy *L* szeregu substancji dodawanych oddzielnie bądź też w różnych wzajemnych kombinacjach do 1% pożywki agarowej z dodatkiem 20% surowicy. Śledzono wpływ aureomycyny, chloromycetyny, streptomycyny, albucidu, chlorku litu oraz surowic odpornościowych skierowanych przeciwko szczepom wyjściowym oraz formom *L*. Wzajemne kombinacje tych substancji bez dodatku penicyliny nie doprowadzały z reguły do tworzenia typowych form *L* lub utrzymywania się ich w tej postaci.

Dalsze badania przeprowadzono zatem obserwując łączny wpływ na postacie *L* penicyliny i jednej z wymienionych substancji. Postępowanie nasze polegało na wysiewaniu szczepu wyjściowego lub też już gotowych form *L* na pożywkę zawierającą 400 j. penicyliny w 1 ml oraz odpowiednią ilość interesującego nas środka. Zaobserwowano zmiany morfologiczne dotyczące głównie wyraźnych różnic w wielkości ciał szerokich, stosunku ilościowego ciał szerokich do ciałek elementarnych, tendencji do tworzenia „skupień wrastania", wzrostu w postaci kolonii typu *A* lub *B* oraz w postaci bezkolonijnej (nalot z form *L*).

Penicylina łącznie z chlorkiem litu w stężeniu 0,5 - 1,5% wywołuje tworzenie kolonii *L* przeważnie typu *B*, otoczonych szeroką strefą wyjątkowo dużych i dobrze barwiących się ciał kulistych (Fot. 7).

Podobny efekt wywiera łączne działanie penicyliny i niskich stężeń chloromycetyny, zaznaczające się ponadto bardzo wybitną wakuolizacją ciał szerokich, słabiej niż zwykle deformujących się przy sporządzaniu preparatów. Zaobserwowaliśmy ponadto, iż w obecności chloromycetyny powstaje wyraźnie większa ilość kolonii typu *B*.

Albucid wraz z penicyliną wpływa na obfitsze tworzenie się kolonii typu *A*, przy obecności pojedynczych kolonii typu *B*. Przy wyższych stężeniach albucidu (80 - 100 γ/ml) kolonie nie wrastają w głąb pożywki, nie powstają kolonie *L*, a drobnoustroje tworzą bardzo delikatny, bezkolonijny nalot. Mikroskopowo stwierdza się rozpad i zmniejszenie liczby

ciał olbrzymich przy jednoczesnej przewadze elementów bardzo drobniutkich. Nieliczne ciała szerokie są stosunkowo nieduże, bardzo delikatne i łatwo defrmujące się. Niekiedy na pożywkach z albucidem i penicyliną zamiast elementów morfologicznych formy *L* obserwowaliśmy twory nitkowate z miejscami tylko zaznaczoną tendencją do tworzenia ciał kulistych (Fot. 8 - 10).

Streptomycyna oraz aureomycyna nie wpływają wyraźnie na morfologię postaci *L*, obserwowaliśmy jedynie przewagę kolonii typu *B*. Podobnie nie zaobserwowaliśmy zmian morfologicznych w obecności surowicy swoistej.

Stwierdziliśmy, że na pożywkach bez penicyliny drobnoustroje w formie bakteryjnej rosną w obecności takich stężeń innych antybiotyków, które łącznie z penicyliną hamują tworzenie kolonii *L*.

Dalsze badania przekonały nas, że do śledzenia wpływu określonej substancji na formy *L* sama znajomość jej stężenia w pożywce jest co najmniej niewystarczająca. Niemal decydującym o wynikach czynnikiem okazała się wielkość *inoculum* wysiewanego w poszczególnych doświadczeniach, ponieważ w różnych warunkach, wobec różnych substancji z tej samej ilości wysianych komórek powstaje różna ilość kolonii *L*.

Metodą dającą najwyraźniejsze wyniki, pozwalające na tabelaryczne ujęcie zagadnienia, jest jednoczesne wysiewanie znanego, malejącego *inoculum*. Pozwala to uchwycić w badanych warunkach zależność między liczbą komórek wysiewanych, a uzyskiwaną z nich ilością kolonii typu *L*.

Technika stosowana przez nas przedstawia się następująco: na pożywkę zawierającą 1% agaru, 20% surowicy, 400 j./ml penicyliny oraz odpowiednie stężenie badanej substancji wysiewaliśmy tym samym uszkiem seryjne rozcieńczenia zawiesiny komórek wyjściowych. Gęstość zawiesiny określaliśmy przy pomocy skali Mac Farlanda. W każdym rozcieńczeniu ilość komórek była 5-krotnie mniejsza niż w poprzednim. Wyniki odczytywaliśmy po 48, 72 i 96 godzinach, notując rozcieńczenie *inoculum*, z którego pojawiał się jeszcze wzrost w postaci kolonijnej, oraz przeliczając na ile komórek szczepu wyjściowego wyrasta 1 kolonia *L*. Jako kontrole służyły podłoża zawierające oprócz składników odżywczych 400 j./ml. Uzyskane wyniki ilustrują tabele I i II.

Tabela I

Rozcieńczenie zawiesiny	1/25	1/125	1/625	1/3125	1/15625	1/78125	1/390625
Ilość komórek wysiewanych	350000	70000	14000	2800	560	112	22
Streptomycyna 0,5 γ/ml	+	+	+	+	+	—	—
Streptomycyna 1,0 γ/ml	+	+	+	+	—	—	—
Streptomycyna 1,5 γ/ml	+	—	—	—	—	—	—
Streptomycyna 2,0 γ/ml	+	—	—	—	—	—	—
Streptomycyna 3,0 γ/ml	—	—	—	—	—	—	—
Pożywka bez surowicy	+	—	—	—	—	—	—
Kontrola	+	+	+	+	+	—	—

— wzrost kolonii *L*

Tabela I przedstawia wyniki badań nad ilościowym wzrostem kolonii *L* na pożywce zawierającej oprócz 400 j. penicyliny na ml wzrastające dawki streptomycyny (od 0,5 do 3,0 γ/ml). Na każdą płytkę wysiewano tym samym uszkiem rosnące rozcieńczenia zawiesiny szczepu *Proteus mirabilis 123*. Plusami zostały zaznaczone rozcieńczenia, z których wyrastały kolonie *L*. Z tablicy tej widać wyraźnie hamujący wpływ streptomycy na tworzenie kolonii *L*. O ile w kontroli nie zawierającej streptomycyny, z zawiesiny rozcieńczonej 1/15625, co odpowiada 560 wysianym komórkom, wyrasta 6 kolonii *L*, to przy 2,0 γ streptomycyny na ml ślady wzrostu w postaci 2 kolonii stwierdzono w rozcieńczeniu 1:25. W przybliżeniu zatem 1 kolonia *L* bez streptomycyny powstawała na około 95 komórek wyjściowych, zaś w obecności 2 γ tego antybiotyku na około 175 000.

W dalszych rubrykach tabeli I uwidacznia się wyraźnie rola wzbogacania pożywek surowicą dla uzyskania kolonii *L*. W wypadku, gdy podłoże nie zawiera surowicy, możliwość pojawienie się 1 kolonii *L* jest blisko 3000 razy mniejsza niż przy zwykłym sposobie hodowli postaci *L*.

Tabela II potwierdza dużą przydatność stosowanej przez nas metodyki także w odniesieniu do innych czynników.

Tabela II

Rozcieńczenie zawiesiny	1/25	1/125	1/625	1/3 125	1/15 625	1 78 125	1/390 625	1/1 953 125
Ilość komórek wysiewanych	500 000	100 000	20 000	4 000	800	160	32	6
Chloromycetyna 0,5 γ/ml	+	+	+	+	+	+	+	—
1,0 γ/ml	+	+	+	+	+	+	—	—
2,0 γ/ml	+	+	+	—	—	—	—	—
4,0 γ/ml	skupienie ciał kulistych							
6,0 γ/ml	pałeczki bez zmian morfologicznych							
Albucid 50,0 γ/ml	+	+	+	—	—	—		
250,0 γ/ml	—	—	—	—	—	—	—	—
Chlorek litu 1%	+	+	+	+	+	—		
Aureomycyna 2,0 γ/ml	+	+	—	—	—	—	—	—
Surowica odpornościowa	+	+	—	—	—	—	—	—
Kontrola	+	+	+	+	+	+	+	—

\+ — wzrost kolonii *L*

Na płytce kontrolnej zawierającej 400 j. penicyliny na ml wzrost w postaci *L* kolonii sięga rozcieńczenia 1 : 390 625, co odpowiada wysianiu 32 komórek. Podobnie rosną kolonie *L* w obecności 0,5 γ chloromycetyny/ml. Przy 2 γ tego antybiotyku dla otrzymania 1 kolonii *L* trzeba

wysiać aż 10 000 komórek, przy 4 γ kolonie *L* nie tworzą się, mimo że na powierzchni pożywki można stwierdzić obecność ciał kulistych, układających się w niewielkie skupienia, lecz nigdzie nie spostrzega się wrastania. Przy 6 γ następuje całkowite zahamowanie, nie dochodzi do tworzenia żadnych form zmienionych.

Z dalszych rubryk tabeli II widać, że albucid i aureomycyna upośledzają tworzenie kolonii *L*. Okazuje się także, iż powszechnie używany chlorek litu działa sam przez się hamująco na formy *L*. Wysiewanie różnych rozcieńczeń zawiesiny wyjściowej pozwoliło w uchwytny sposób stwierdzić hamowanie wzrostu form *L* przez surowicę odpornościową skierowaną przeciwko szczepowi wyjściowemu. Okazało się, że 1 kolonia *L* wyrasta w tych warunkach około 400 razy rzadziej niż w kontroli.

Badania nasze wskazują na różny stopień zdolności poszczególnych komórek szczepu wyjściowego do tworzenia form *L*. W warunkach optymalnych, w obecności penicyliny, surowicy końskiej i 1% agaru 1 kolonia *L* powstaje na około 30 - 50 komórek wysianych. Obecność w podłożu jednej z omawianych substancji zmniejsza możliwość zapoczątkowania wzrostu kolonijnego typu *L*. Podobnie działa brak w pożywce surowicy jako czynnika odżywczego.

W ten sposób hodowla zaczyna wyraźniej przedstawiać się nam jako populacja komórek o różnych cechach indywidualnych. Na podstawie naszych szczupłych obserwacji nie mogliśmy potwierdzić tezy o kompensacyjnej roli zmienności typu *L* w warunkach dysgenetycznych, ponieważ w badaniach swych nie spotkaliśmy się nigdy z obfitszym, w porównaniu z kontrolą, wzrostem kolonii *L* przy użyciu różnych substancji.

Zastosowanie metody rozcieńczania zawiesiny wyjściowej pozwala prześledzić nawet subtelne wpływy różnych środków, a zwłaszcza antybiotyków, których działanie w pewnych stężeniach przy zastosowaniu zwykłej techniki zostałoby po prostu przeoczone. Otwierają się możliwości przebadania nie tylko substancji hamujących, ale i stymulujących wzrost form *L*. Dużym udogodnieniem jest także łatwość odczytywania wyników i ich duża stałość pozwalająca na matematyczne ujmowanie zagadnienia.

Ilustrujące badania mikrofotografie wykonaliśmy z pomocą mikroskopu-kamery typu MeF Reicherta.

A. Horoszewicz and *J. Horoszewicz*

OBSERVATIONS ON THE INFLUENCE OF PENICILLIN AND OTHER ANTIBIOTICS UPON *L* FORMS OF *PROTEUS MIRABILIS*

Summary

Authors studied the growth of *L* forms of *Proteus mirabilis* and the influence of some antibacterial agents on these forms.

The *L* forms were obtained on Levinthal medium (agar — 1%, horse serum — 20%, penicillin — 100 - 400 units per ml).

P. mirabilis developed three types of *L* colonies. (Phot. 1 - 10. Table I).

The specific antisera were obtained by immunisation of rabbits with bacteria as well as with *L* forms.

The influence of penicillin, aureomycin, chloramphenicol, streptomycin, albucid, lithium chloride and specific immune serum was investigated.

In this respect changes in the form and amount of large round bodies, of elementary bodies and of colonies were noted. The amount of *L* colonies appearing per 100 of bacterial cells in inoculum was measured in normal medium and in media with antibacterial agents added.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 15 - 19

Z. Kwiatkowski, W. Kunicki-Goldfinger i *Z. Lorkiewicz*

NIEKTÓRE WŁASNOŚCI FIZJOLOGICZNE PAŁECZKI ODMIEŃCA POSPOLITEGO W STADIUM *L*

KOMUNIKAT TYMCZASOWY

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie

Znaczna większość dotychczasowych badań nad formami *L* dotyczy zagadnień morfologicznych. Nieliczne są natomiast prace z zakresu fizjologii bakterii w stadium *L*.

Wprawdzie stan naszych wiadomości o morfologii różnych elementów cyklu *L* i o samym jego przebiegu jest jeszcze stale niewystarczający, należy jednak już obecnie więcej uwagi poświęcić tej dziedzinie badań, która umożliwi rozstrzygnięcie podstawowych, niewyjaśnionych dotąd zagadnień, na przykład mechanizmu przemiany bakterii w formy *L*, roli takich czynników jak penicylina, niektóre aminokwasy, surowice swoiste itp.

Nasze badania mają na celu przede wszystkim wyjaśnienie mechanizmu przejścia bakterii w formy *L*.

Poniżej przytoczono rezultaty wstępnych obserwacji nad niektórymi własnościami fizjologicznymi form *L* u *Proteus vulgaris*.

Badania te koncentrują się obecnie wokół trzech zagadnień:

1) wymagań wzrostowych bakterii w stadium *L*,

2) zdolności do rozkładania niektórych substratów przez bakterie w stadium *L*,

3) występowania i działania niektórych enzymów u form *L*.

BADANIA NAD WYMAGANIAMI WZROSTOWYMI FORM *L PROTEUS VULGARIS*

Dotychczas przebadano wpływ wyciągu drożdżowego, wyciągu wątrobowego i skrobi na formy *L* pałeczki odmieńca pospolitego.

a) Wpływ wyciągu wątrobowego

Do agaru wzbogaconego surowicą (20%) i bez surowicy dodawano wyciąg wątrobowy (sporządzony analogicznie do bulionu Tarrozi'ego) w ilości 1, 5, 10, 20 i 40%. Podłoża zarówno z surowicą, jak i bez niej zawierały stałą ilość penicyliny krystalicznej (2 000 jednostek międzynarodowych na 1 ml podłoża).

Na tak przygotowaną pożywkę wysiewano zawiesinę pałeczek odmieńca z 18-godzinnej hodowli bulionowej o określonej gęstości.

Podobnie wysiewano bakterie na podłoże kontrolne z surowicą i bez surowicy i z dodatkiem 2 000 jednostek penicyliny na 1 ml. Podłoża kontrolne nie zawierały wyciągu wątrobowego.

Po 48 godzinach liczono kolonie *L* na podłożach z wyciągiem i porównywano z ilością na pożywkach kontrolnych.

Do liczenia kolonii *L* używano zarówno płytek Petriego jak i hodowli szkiełkowych według Ørskova.

Stwierdzono, że na podłożach bez surowicy wyciąg wątrobowy w stosowanych stężeniach nie tylko nie stymuluje wzrostu, lecz przeciwnie hamuje rozwój tego typu kolonii *L*, który normalnie rozwija się i w nieobecności surowicy.

W przypadku stosowania podłoży z surowicą zauważono, że ilość kolonii *L* jest około pięciokrotnie większa (w porównaniu z podłożem kontrolnym bez wyciągu) przy dodaniu wyciągu w ilości 1%.

Przy stosowaniu większych stężeń (5 i 10%) ilość kolonii *L* wybitnie zmniejsza się.

Interesujący jest natomiast fakt, że w wielokrotnie powtarzanych doświadczeniach stwierdzono znaczną stymulację wzrostu przy 20% stężeniu wyciągu wątrobowego. Ilość kolonii *L* zwiększa się nawet dwukrotnie w porównaniu z podłożem kontrolnym.

Tablica I

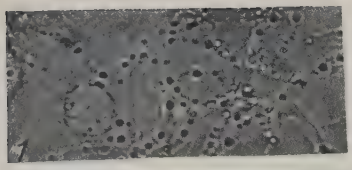
Do pracy A. Horoszewicz i J. Horoszewicz, str. 9.

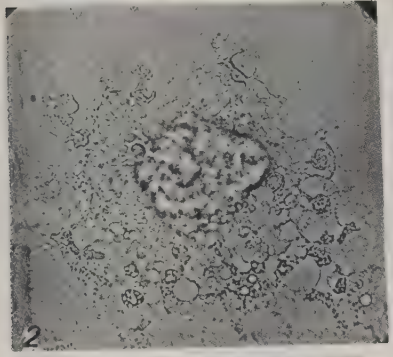
Fot. 1. Preparat niebarwiony. *Proteus 123* w 5 godzin po wylaniu na płytkę zawierającą 100 j. penicyliny/ml. 1300 x.
Fot. 2. Preparat niebarwiony. Powstawanie „skupienia wrastania" po upływie 12 godzin od chwili wysiewu. 400 x.
Fot. 3. Kolonie typu *A*. 20 x.
Fot. 4. Liczne kolonie *L* typu *B* oraz pojedyncze typu *A*. Hodowla 48-godzinna. 20 x.
Fot. 5. Kolonia *L* typu *C*, średnicy 1,4 cm, wysokości 1,2 mm. Przekrój w płaszczyźnie pionowej. 10 x.
Fot. 6. Preparat odbitkowy niebarwiony. Zwraca uwagę silnie wykształcone, wrastające w pożywkę centrum złożone z „ciałek elementarnych:'. 40 x.
Fot. 7. Met. Giemsy: preparat odbitkowy. Ciała kuliste powstałe pod wpływem penicyliny i chlorku litu. 1300 x.
Fot. 8. Met. Giemsy. Preparat odbitkowy. Ciała kuliste powstające pod wpływem penicyliny. 1300 x.
Fot. 9. i 10. Met. Giemsy. Preparat odbitkowy. Postacie *L* powstałe w obecności penicyliny i albucidu. 1300 x.

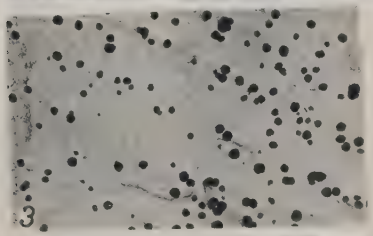
Table I

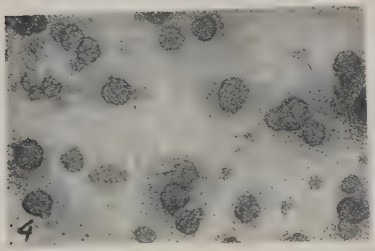
To the paper A. Horoszewicz and J. Horoszewicz, p. 9.

Phot. 1. *Proteus 123*, five hours incubation on agar with 100 units of penicillin per 1 ml, 1300 x.
Phot. 2. Young *L* colonies, 12 hours incubation, 400x.
Phot. 3. *L* colonies, type *A*, 20 x.
Phot. 4. Many *L* colonies type *B* and few of type *A*, 48h culture, 20 x.
Phot. 5. Cross section of *L* colony, type *C*. Diameter of colony — 14 mm; heigth — 12 mm, 10 x.
Phot. 6. *L* colonies, 40 x.
Phot. 7. Large round bodies on agar with penicillin and lithium chloride. Giemsa stain, 1300 x.
Phot. 8. Large round bodies on agar with penicillin. Giemsa stain, 1300 x.
Phot. 9. and 10. *L* forms on agar with penicillin and albucid. Giemsa stain, 1300 x.

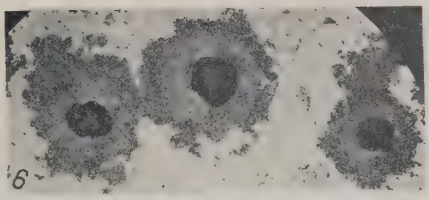

1

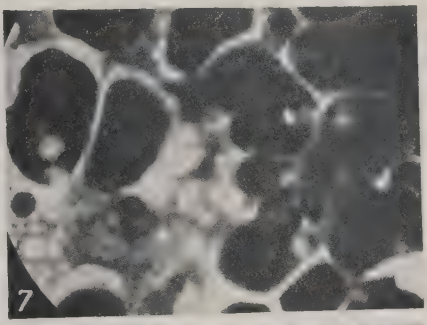

2

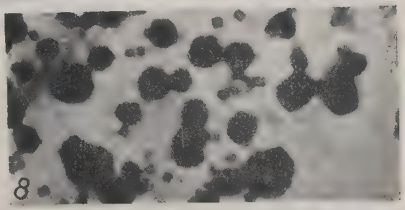

3

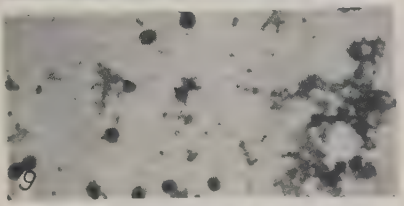

4

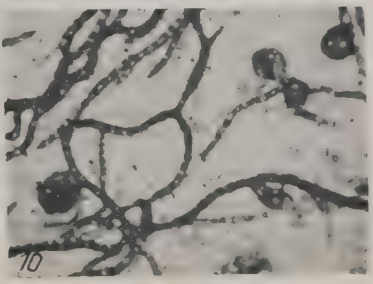
5


6


7


8


9


10

Przy stężeniu 40% zauważono natomiast prawie zupełne hamowanie wzrostu kolonii *L*.

b) Wpływ wyciągu drożdżowego

Doświadczenie wykonane zostało w sposób identyczny jak w przypadku badania wpływu wyciągu wątrobowego. Używano wyciągu drożdżowego (wyciąg autoklawowany według Waksmana) w ilości 1, 5, 10, 20 i 40%.

Stwierdzono, że wyciąg drożdżowy we wszystkich zastosowanych koncentracjach uniemożliwia przejście bakterii w fazę *L* na podłożach bez surowicy.

Natomiast w obecności surowicy dodatek wyciągu drożdżowego nie wpływa na ilość kolonii *L*.

c) Wpływ skrobi

Stosowano dodatek skrobi w ilości 1, 5 i 10%. Na podłożach bez surowicy wyraźnie stymulujące działanie obserwowano po dodaniu 10% skrobi. Ilość koloni *L* zwiększała się w tych przypadkach przeszło dwukrotnie. Dodatek 1% skrobi nie wywierał istotnego wpływu na ilość mikrokolonii typu *L*. Natomiast przy 5% skrobi dochodziło do znacznej (nawet dziesięciokrotnej) redukcji ilości kolonii *L* w porównaniu z doświadczeniami kontrolnymi.

Na pożywkach z surowicą skrobia wywierała nieznaczne działanie stymulujące, bez względu na jej stężenie w podłożu.

BADANIA NAD ROZKŁADEM NIEKTÓRYCH SUBSTRATÓW PRZEZ FORMY *L*

Do doświadczeń używano jedynie form *L* pałeczki odmieńca pochodzących z wielokrotnych pasaży (dwudziesty lub nawet starszy pasaż). Jako podłoża używano 1,5% agaru z 20% surowicy i z 2 000 jednostek penicyliny na 1 ml podłoża. Przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia wykonywano próbny pasaż na podłoże bez penicyliny. Stwierdzono, że przy używaniu form *L* pochodzących z wielokrotnych przesiewów, w ciągu 48 godzin nie dochodzi do rewersji do postaci bakteryjnej.

Dzięki używaniu form *L* wielokrotnie już pasażowanych oraz dzięki pasażom kontrolnym praktycznie wykluczano ewentualność przeprowadzania badań fizjologicznych na hodowlach „mieszanych", tj. złożonych z form *L* oraz z macierzystych bakterii.

a) Fermentacja węglowodanów

Badania przeprowadzono w trzech seriach: na agarze z dodatkiem cukru, na bulionie cukrowym zawierającym indykator oraz na wodzie peptonowej z cukrem i wskaźnikiem.

Do doświadczeń używano zarówno form *L* typu *3A*, jak i *3B*, dzięki czemu można było porównać własności biochemiczne tych dwóch typów wzrostu *L*.

Dla zbadania fermentacji na podłożach stałych stosowano pożywkę o następującym składzie: agar odżywczy (1,5-procentowy), 0,5% badanego cukru, 2 000 j. penicyliny na 1 ml pożywki.

Kolonie *L* wysiewano przez przyłożenie kostki agarowej ze wzrostem *L*. Po 24 godzinach kostki zdejmowano. Po zaobserwowaniu wzrostu typu *L* na kolonie nalewano roztwór błękitu bromotymolowego. Zmiana

zabarwienia błękitu w sąsiedztwie kolonii *L* świadczy o wytwarzaniu kwasu z badanego cukru.

Stwierdzono, że formy *L* typu *3B* fermentują glikozę, nie fermentują laktozy, sacharozy, maltozy i mannitolu. Formy *L* typu *3A* fermentują glikozę i maltozę. Z laktozy, sacharozy i mannitolu nie wytwarzają kwasów.

Szczep macierzysty zachowywał się w sposób typowy dla *Proteus vulgaris*.

Badania na wodzie peptonowej z dodatkiem 0,5% cukru, 2 000 j. penicyliny na 1 ml pożywki oraz błękitem bromotymolowym wykazały, że glikoza jest rozkładana przez formy *L* (typ *3A* i *3B*) dopiero po jednym tygodniu. Sacharoza, laktoza, maltoza i mannitol nie były fermentowane.

W doświadczeniach, w których zamiast wody peptonowej używano bulionu, już po 2 dniach nastąpił rozkład glikozy i maltozy. Sacharoza, laktoza i mannitol nie ulegały rozkładowi.

W przypadku obserwacji na podłożach płynnych, do wody peptonowej lub bulionu wrzucano kostki ze wzrostem kolonii *L* (zarówno typ *3A* jak i *3B*). W tych warunkach wzrost miał miejsce tylko na powierzchni kostki agarowej.

Badania nad zdolnością fermentowania niektórych substratów wykazały, że:

1) jedyna zaobserwowana różnica między formami *L* a szczepem wyjściowym dotyczyła zdolności fermentowania maltozy, która w zależności od rodzaju podłoża mogła być fermentowana lub też nie,

2) zdolność do fermentowania niektórych substratów uzależniona jest od rodzaju podłoża (agar, woda peptonowa, bulion),

3) formy *L* typu *3A* różnią się od typu *3B* niezdolnością do fermentowania maltozy na podłożu stałym.

b) Rozkład mocznika

Badania przeprowadzano na agarze peptonowym z 1% mocznika, i 2 000 j. penicyliny na 1 ml podłoża. Jako indykatora używano czerwieni fenolowej, którą wkraplano na podłoże.

Dodatek surowicy do pożywki powodował alkalizację już w nieobecności mocznika, dlatego też do doświadczeń używano tylko form *L* typu *3B* (rozwijających się również i w nieobecności surowicy).

Stwierdzono, że mocznik był rozkładany po 48 godzinach.

c) Wytwarzanie siarkowodoru

Zarówno szczep macierzysty, jak również formy *L* typu *3A* i *3B* wytwarzały siarkowodór.

WYSTĘPOWANIE I DZIAŁANIE OKSYDAZY, PEROKSYDAZY CYTOCHROMOWEJ I KATALAZY U FORM *L PROTEUS VULGARIS*

Wykazano, że formy *L* pałeczki odmieńca dają dodatnią próbę na oksydazę cytochromową (odczyn Nadi), peroksydazę (próba benzydynowa) oraz katalazę.

W próbach tych posługiwano się mechanicznie zebranym z podłoża wzrostem form *L*.

Identyczny wynik uzyskano badając pałeczki odmieńca pospolitego.

W uzupełnieniu tych badań stosowano wysiewy bakterii oraz przesiewy form *L* na podłoża agarowe ($pH = 7.8$) z różnymi stężeniami KCN, bez dodatku penicyliny.

Użyto następujących stężeń KCN: 1 : 10 000, 1 : 1 000, 1 : 500, 1 : 100, 1 : 50.

Stwierdzono, że zablokowanie układu żelazo-porfirynowego przy pomocy KCN nie jest wprawdzie czynnikiem indukującym przechodzenie bakterii w formy *L*, niemniej jednak nie powoduje zahamowania wzrostu mikrokolonii *L*.

Przy pasażowaniu form *L* na podłoża bez penicyliny z dodatkiem KCN w wyszczególnionych powyżej stężeniach — formy *L* nie ginęły, a przeciwnie wyraźnie mnożyły się nawet przy tych koncentracjach cyjanku potasu (1 : 50), przy których bakterie nie rozwijały się.

Na podłożach z KCN nie obserwowano również rewersji do postaci bakteryjnej.

Jednak doświadczenia nad utrwaleniem form *L* przy pomocy KCN dotychczas były zbyt krótkotrwałe aby mogły pozwolić na wysnucie ostatecznego wniosku.

Przesiew form *L* z KCN na podłoża bez KCN i bez surowicy zawsze ulegał rewersji do postaci bakteryjnych.

Z. Kwiatkowski, W. Kunicki-Goldfinger and *Z. Lorkiewicz*

SOME PHYSIOLOGICAL CHARACTERICTICS OF *L* FORMS OF *PROTEUS VULGARIS*

Summary

Liver extract inhibited the growth of *L* forms on agar media without serum. On the media containing horse serum liver extract in concentration not higher than 1% stimulated growth of *L* colonies.

The yeast extract in absence of serum inhibited the transformation of bacteria into *L* forms.

Starch (10 %) exhibited stimulating effect in absence of serum. On media containing serum this effect was very weak.

Fermentation of glucose, saccharose, lactose, maltose and mannitol by *L* forms of *P. vulgaris* was studied on solid and liquid media.

L forms type *3A* did not attacked maltose on solid media. Type *3B* fermented this sugar in similar conditions.

There is no difference between *L* and bacterial forms of *P. vulgaris* in the ability to production of H_2S and in the activity of urease, catalase, respiratory enzymes.

L forms were exceptionally resistant to KCN. The aboundant growth was observed even in concentration 1 : 50, inhibiting wholly growth of bacterial forms. No reversion to bacterial forms was noted on media containing KCN even in absence of penicillin.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 21 - 26

A. Sander, M. Tabaczyński i *Z. Kwiatkowski*

TYPOLOGIA FORM *L* U *PROTEUS VULGARIS*

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie

Zmiany morfologiczne zachodzące podczas przejścia bakterii w fazę *L* polegają na obrzmiewaniu do dużych ciał oraz dalszym rozwoju tych ostatnich, prowadzącym w rezultacie do wytworzenia charakterystycznych mikrokolonii, zwanych koloniami *L*.

Powstałe mikrokolonie *L* są u wszystkich badanych gatunków bakterii podobne; składają się z ziarnistego centrum i nie zawsze występującej brzeżnej strefy dużych ciał. Zbliżone są więc swą morfologią do kolonii zarazków z grupy pleuropneumonii.

Jednak nawet w obrębie jednego gatunku bakterii można niekiedy znaleźć różnice między koloniami form *L*. I tak D i e n e s, a z badaczy francuskich M i n c k, dzielą kolonie *L* na dwa typy.

Według D i e n e s a u wszystkich gatunków bakterii, dających kolonie *L*, występują kolonie nazwane przez niego typem *3A*. Są one drobne, o średnicy do 500 μ. Składają się z nieregularnego skupienia ziarnistości otoczonego niekiedy luźną i nieregularną strefą dużych ciał. Do wzrostu wymagają agaru miękkiego, wzbogaconego surowicą lub *ascites*. Pojawiają się pod wpływem różnych czynników powodujących transformację *L* i rosną tylko na powierzchni pożywki. Powrót do postaci bakteryjnej następuje rzadko i po dłuższym czasie. Obok tych kolonii można uzyskać formy nieco różne morfologicznie i o innych wymaganiach hodowlanych, występujące według Dienesa tylko u *Proteus* i *Salmonella*, określone jako typ *3B*. Pojawiają się one tylko pod wpływem penicyliny, w niedużej ilości na powierzchni agaru, a masowo przy wsiewie wgłębnym. Są one większe od poprzednich i dochodzą do 1 - 5 mm średnicy. Składają się z ziarnistego, silnie wrośniętego w agar i jednocześnie wypukłego centrum i zwykle regularnej, zbitej strefy brzeżnej, złożonej z dużych ciał. Przechodzą łatwo w formę bakteryjną po inaktywacji penicyliny w podłożu. Do wzrostu nie wymagają agaru miękkiego i surowicy.

Jak widać z powyższego, kryterium rozpoznawczym całej fazy *L* oraz typów kolonii *L* są cechy morfologiczne i hodowlane.

Aby przystąpić do jakichkolwiek szczegółowych badań nad formami *L* konieczne jest możliwie dokładne zapoznanie się z morfologią i przemianami poszczególnych typów fazy *L* oraz ich wymaganiami hodowlanymi. Taki też był cel niniejszej pracy.

MATERIAŁ

Badania przeprowadzono na 5 gatunkach bakterii gramujemnych. Jako obiekt szczegółowych badań wybrano szczep *Proteus* wyizolowany z kału ludzkiego. U pozostałych 4 szczepów, tj. *Escherichia coli, Salmonella parathyphi B, S. typhimurium* i *Vibrio cholerae*, badano tylko zdolność do przechodzenia w fazę *L* i możliwość utrzymania kolonii *L* w dalszej hodowli.

METODY

Do hodowli fazy *L* używano miękkiego, 1,5% agaru z dodatkiem 25% surowicy lub taką samą ilością bulionu, gdy hodowle prowadzono bez surowicy. Jako środka transformującego używano penicyliny krystalicznej G, produkcji krajowej, w ilości 2 000 j. na ml podłoża. Płytki zasiewano powierzchniowo lub wgłębnie hodowlą bulionową bakterii i inkubowano w temperaturze 37° w normalnych warunkach tlenowych lub beztlenowo, pochłaniając tlen przy pomocy pyrogallolu.

Próbowano też osiągnąć przejście bakterii w fazę *L* w bulionie zawierającym penicylinę, z dodatkiem surowicy lub bez niej. Udawało się to tylko wtedy, gdy do bulionu wrzucono kostkę agarową.

Przesiewów fazy *L* na podłoża stałe dokonywano kilkoma sposobami:

1) pocierając powierzchnię płytki kostką agaru ze wzrostem *L*,
2) przykładając kostkę do powierzchni płytki,
3) przesiewając ezą,
4) pasażując wgłębnie przez dodanie do rozpuszczonego agaru płynu fizjologicznego, w którym uprzednio roztarto agar ze wzrostem *L*.

Przy przesiewach z podłoży stałych na płynne, kostki agarowe ze wzrostem *L* zanurzano w bulionie z surowicą i penicyliną, lub bez surowicy. Niekiedy dodawano też niezasiane kostki agarowe.

Do obserwacji używano mikroskopu R.O.W. i Lumipan. Zdjęcia wykonano aparatem Mikrophot R.O.W.

Obserwacje przeprowadzono wprost na płytkach ze wzrostem *L*.

Aby poznać szereg kolejnych zmian, prowadzących do wytworzenia kolonii *L*, przeprowadzono ciągłą obserwację dowolnie wybranego miejsca na płytce zawierającej agar miękki z surowicą i penicyliną, zasianej 18-godzinną hodowlą bulionową *Proteus*.

Po wysianiu na płytkę bakterie normalnie dzielą się tworząc skupienia. Po około 1 godzinie proces podziału zostaje zahamowany i bakterie zaczynają gwałtownie obrzmiewać, tak że po 3 godzinach wszystkie widoczne bakterie przechodzą w duże ciała, twory kuliste lub owalne, otoczone cienką ale widoczną błonką (fot. 1, 2, Tabl. II — po str. 32). Zawartość wnętrza, początkowo jednolita, zaczyna się szybko zmieniać. Pojawiają się wakuole (fot. 3). W ciągu następnych 6 godzin większość dużych ciał ulega rozpadowi (fot. 4). Rozpad jest zawsze poprzedzony silną wakuolizacją, ale u niektórych, zresztą nielicznych, dużych ciał obok wodniczek można zauważyć podczas rozpadu pojawienie się delikatnych ziarnistości, które wysypują się z ich wnętrza, rozmnażają się na agarze i po 12 godzinach od chwili wysiania są zupełnie wyraźnie widoczne (fot. 5, 6). Dalszy rozwój tych ziarnistości prowadzi do wytworzenia kolonii *L*.

Niektóre skupienia ziarenek rozwijają się szybko, tworząc regularny okrąg wrośnięty w agar i po pewnym czasie w strefie brzeżnej zaczynają produkować duże ciała (fot. 7 - 9). W ten sposób powstaje kolonia podobna tak morfologicznie jak i właściwościami hodowlanymi do dienesowskiego typu *3B*. Inne skupienia ziarnistości rosną wolno, pozostają nieregularne, duże ciała produkują rzadko i w niewielkiej ilości (fot. 10). Są to kolonie typu *3A*, pojawiające się tylko w podłożach z surowicą po 48-godzinnej inkubacji. W hodowli na podłożach bez surowicy można uzyskać tylko kolonie typu pierwszego.

Na podłożach z surowicą rosną dobrze oba typy kolonii (fot. 10), ale bardziej szczegółowe badania przeprowadzone na *Proteus vulgaris* wykazały, że zarówno pojawianie się kolonii małych, jak i ilość kolonii dużych zależy nie tylko od obecności surowicy. Płytki zasiewano hodowlą bulionową *Proteus* po różnym czasie jej inkubacji w termostacie. Okazało się, że wiek hodowli użytej jako *inoculum* ma duży wpływ na ilość i rodzaj powstałych kolonii *L*. Płytki zasiewano dużą ilością bakterii. Początkowe stadia przemiany przebiegały jednakowo. Różnice zaznaczały się dopiero po procesie rozpadu dużych ciał, w rozwoju uwolnionych z nich ziarnistości. Kolonie typu *3B* pojawiały się przy każdym wieku (od 1-godzinnego do 5-dniowego) *inoculum* użytego do wsiewu. Maksymalna ich ilość przypadała na *inoculum* w wieku 16 - 36 godzin, najmniej było ich przy hodowli 2-godzinnej. Natomiast kolonie małe, *3A*, rozwinęły się tylko przy użyciu *inoculum* w wieku 12 - 36 godzin, wystąpiły jednak masowo, w ilości około 40 razy większej niż kolonie *3B*. Wydaje się, że zjawisko powyższe można powiązać z cytomorfozą bakterii.

Przy porównaniu hodowli powierzchniowych z wgłębnymi okazało się, że przy tej samej ilości wsianych bakterii w hodowli wgłębnej uzyskuje się o wiele większą ilość kolonii. Kolonie wgłębne są morfologicznie zupełnie jednolite. Na ogół są pozbawione dużych ciał, wyjąwszy te, które wyrosły na powierzchni pożywki. Trudno określić czy należą do typu *3A* czy *3B*, jednak porównanie hodowli na agarze z surowicą i bez niej wskazuje na to, że wgłębnie rośnie tylko typ *3B*.

Wzrost *L* na podłożach płynnych udawało się osiągnąć tak w obecności surowicy jak przy jej braku. Po około 10 dniach na kostkach agarowych wrzuconych do bulionu pojawiły się kolonie. Bulion w probówce stał się lekko opalizujący. W preparatach barwionych metodą Giemzy nie stwierdzono bakterii, ale drobniutkie, czerwono zabarwione ziarenka. Bulion wysiany na agar dawał wzrost nielicznych kolonii *L*.

Powyższe obserwacje przeprowadzono na *Proteus vulgaris*. Przebadano również cztery inne gatunki bakterii, a mianowicie świeżo wyizolowane szczepy *E. coli*, *S. paratyphi B*, *S. typhimurium* i muzealny szczep *V. cholerae*. U *S. typhimurium*, podobnie jak u *Proteus*, udało się uzyskać kolonie *L* w warunkach tlenowych i beztlenowych. Pozostałe gatunki przechodziły w fazę *L* tylko w warunkach beztlenowych. Badane szczepy dawały oba typy kolonii, wyjąwszy *V. cholerae*, u którego uzyskano tylko kolonie *3B* (fot. 11 - 14). Jest to ciekawe o tyle, że jak wynika z dostępnej literatury kolonie *3B* miałyby powstawać tylko u *Proteus* i *Salmonella*. Wszystkie otrzymane kolonie *L* udało się utrzymać w dalszej hodowli przez pasaże.

Obok uzyskania przejścia bakterii w fazę *L*, osobnym zagadnieniem jest utrzymanie wzrostu *L* w dalszej hodowli. Przesiew na świeże podłoża przy pomocy ezy jest trudny ze względu na bardzo nikły i delikatny wzrost i miękkość agaru. Jedynie kolonie typu *3B* dają się w ten sposób przesiewać. Pasażowano wzrost *L* pocierając powierzchnię płytki kostką agarową z koloniami, lub przykładając taką kostkę do powierzchni płytki na 24 godz. Ogółem przeprowadzono 26 pasaży na świeże podłoża z surowicą i penicyliną. Przy II i III pasażu na agarze z surowicą zauważono przechodzenie kolonii typu *3B* w *3A* (fot. 15). W dalszych pasażach uzyskano czysty wzrost kolonii *3A*.

Pocieranie powierzchni płytki kostką agaru ze wzrostem okazało się dobrą metodą namnażania kolonii *3A*.

Próbowano pasażować kolonie *3A* na podłoże bez penicyliny. Wzrost był tu obfitszy niż w obecności penicyliny, ale po kilku przesiewach, zależnie od tego jak długo hodowano je uprzednio na podłożach z penicyliną, następowała rewersja do form bakteryjnych. Okazało się, że aby otrzymać kolonie *3A* na podłożu bez penicyliny konieczne są częste — co 36 godzin — przesiewy na świeże podłoża.

Aby uzyskać przesiewy kolonii *3B* pasażowano wgłębne hodowle rozcierając agar ze wzrostem w płynie fizjologicznym, który następnie dodawano do płynnego agaru bez surowicy przed wylaniem na płytki.

Po 17 takich pasażach płyn fizjologiczny po roztarciu w nim wzrostu wgłębnego wysiano powierzchniowo na agar z surowicą i penicyliną. Już w drugim pasażu powierzchniowym zauważono przejście kolonii *3B* w *3A*. Pasażowano też kolonie *3B* na agar z wyciągiem drożdżowym i penicyliną, gdzie namnażały się obficie, tak że można je było zbierać ezą. Badano również wzrost kolonii *3B* na agarze Cohen-Wheeler z hydrolizatem kazeiny. Wzrost jest wolny, trwa do 4 dni. Kolonie są nieco większe, białawe i lśniące.

Pasażowano kolonie *L* na bulionie z penicyliną i surowicą lub bez niej, przez zasianie bulionu kostkami ze wzrostem. Zaobserwowano przyrost kolonii na zanurzonej kostce: płyn otaczający kostkę nie zawierał bakterii i wysiany na agar dawał nieliczne kolonie typu *3B*, dość różnorodne w szczegółach budowy morfologicznej. Gdy bulion zawierający nie zasianą kostkę agarową zasiano bardzo małą ilością hodowli bulionowej form *L*, kostka pokrywała się koloniami. Zaobserwowano też, że po dodaniu do świeżego bulionu z surowicą, ale nie zawierającego kostki bulionowej, minimalnej ilości płynu z hodowli pojawiały się w nim masowo bardzo drobne ziarnistości barwiące się metodą Giemzy na czerwono. Mogłoby to wskazywać na możliwość rozmnażania się ciałek podstawowych fazy *L* w bulionie.

Przejście bakterii w fazę *L* nie jest zjawiskiem nieodwracalnym. Po ustaniu działania czynnika indukującego może nastąpić powrót do formy bakteryjnej. Często też, gdy czynnik transformujący działa zbyt słabo, zachodzą tylko początkowe zmiany, po czym następuje powrót do postaci bakteryjnej. Według naszych obserwacji elementem ulegającym bezpośrednio rewersji są duże ciała. Dotyczy to zarówno dużych ciał powstałych w pierwszych stadiach transformacji *L*, jak i dużych ciał wytworzonych wtórnie w rozwoju kolonii. Rewersja kolonii zaczyna się w strefie brzeżnej. W wypadku kolonii *3B* otaczające ją duże ciała przechodzą w formy nitkowate a następnie w bakterie. W wypadku kolonii *3A*, u których rewersja zachodzi trudniej i, według danych z literatury, następuje nie u wszystkich szczepów, zaobserwowanie jej przebiegu jest trudniejsze. I tutaj proces ten zaczyna się w brzeżnej strefie kolonii, gdzie często występują nieliczne duże ciała. Kolonia jakby topnieje, ilość ziarnistości zmniejsza się, pęcznieją one a następnie, w wypadku *Proteus*, przechodzą w pływki. Rewersja zachodzi nierównomiernie i zwykle ulega jej tylko część kolonii w hodowli.

Warunkiem zajścia rewersji jest ustanie lub osłabienie działania czynnika transformującego. Zależne ściśle od penicyliny kolonie *3B* przechodzą w formy bakteryjne już w kilka godzin po przesiewie na

podłoża bez penicyliny i utrzymanie ich w dalszej hodowli jest niemożliwe. Na starych płytkach z penicyliną, w miarę stopniowej jej inaktywacji, tj. po trzech do pięciu dniach, można zaobserwować rewersję kolonii *3B*.

Inaczej zachowują się kolonie *3A*. Można je pasażować pewien czas na podłożu bez penicyliny, jeżeli tylko zastosować odpowiednią częstość przesiewu. Szybkość rewersji zależy tu od długości prowadzenia poprzedniej hodowli na pożywkach z penicyliną. Na starych płytkach z penicyliną nawet po 10 dniach inkubacji nie zaobserwowano rewersji.

Zjawisko rewersji pozwala na potraktowanie fazy *L* jako pewnego cyklu o charakterystycznych elementach, co być może zacieśni pojęcie formy *L*, rozciągane niekiedy na formy z fazą tą nie mające nic wspólnego.

Najbardziej charakterystycznym elementem cyklu *L* jest mikrokolonia. Brak istotnych różnic morfologicznych między koloniami *L* u różnych gatunków bakterii. Zarówno kolonie *3A* jak i *3B* różnych bakterii są bardzo podobne. Jednak w obrębie typu *3B* można zaobserwować większą różnorodność morfologiczną, która dotyczy wielkości kolonii, jej kształtu i budowy brzeżnej strefy dużych ciał, a uwarunkowana jest zmianą warunków hodowli.

Często, zwłaszcza przy użyciu jako *inoculum* młodej 4 - 6 godzinnej hodowli bulionowej, można uzyskać kolonie *3B* charakteryzujące się cienką i nieregularną strefą dużych ciał oraz bardzo ostro odgraniczonym ziarnistym centrum (fot. 16). Zdarzają się też, zwłaszcza przy inkubacji w temperaturze niższej niż 37°, kolonie *L* typu *3B* pozbawione strefy dużych ciał. Takie kolonie występują też przy posiewie wgłębnym jako dominujący typ. Na ogół jednak przy hodowli na agarze morfologia kolonii jest jednolita i niewiele odbiega od typowej kolonii *3B* (fot. 10).

Większą różnorodność kolonii dostarczają hodowle bulionowe. Po wsiewie zawiesiny bakterii do bulionu z penicyliną uzyskano na kostce po około 7 dniach inkubacji kolonie duże o grubym, ziarnistym środku, brzegu pofałdowanym, słabo odgraniczonym od wąskiej strefy dużych ciał. Kolonie te po 6 tygodniach inkubacji rozrosły się do średnicy około 0,5 cm, zachowując pofałdowany brzeg i zatraciły zupełnie brzeżną strefę dużych ciał (fot. 17). Gdy podobną hodowlę prowadzono na bulionie z surowicą i penicyliną, uzyskano kolonie posiadające strukturę ziarnistą i bardzo nieliczne duże ciała na obwodzie. Być może zbliżone są one do kolonii typu *3A*. Wysiew płynu otaczającego kolonie na agar z penicyliną i surowicą dostarczył kolonii dużych, bardzo silnie rozrośniętych, o ziarnistym środku i wąskiej strefie dużych ciał.

Obserwacje nasze potwierdzają dienesowski podział kolonii *L*, którego podstawą są cechy morfologiczne i zależność wzrostu od obecności surowicy w podłożu. Dostarczyły one też kilku praktycznych informacji morfologicznych i hodowlanych, niezbędnych do prowadzenia szerszych badań nad fazą *L* bakterii.

A. Sander, M. Tabaczyński and *Z. Kwiatkowski*

TYPOLOGY OF *L* FORM OF *PROTEUS VULGARIS*

Summary

The development of a single *L* colony was followed directly on the agar medium (Table II, phot 1 - 10).

Among *L* colonies, formed by *Proteus vulgaris*, only two types (*3A* and *3B*) described by Dienes, were distinguished.

The appearance of one or other type depended not only on the presence of serum and penicillin but also on the age of inoculum.

The type of *L* forms growing in liquide cultures could not be determined.

Types *3A* and *3B* appeared in cultures of *Salmonella typhimurium* (aerobically and anaerobically), *S. paratyphi B* and *Escherichia coli* (anaerobically). In cultures of *Vibrio cholerae* only type *3B* was observed (Table II, phot. 11 - 14).

By repeated passages on agar media with serum and penicillin, *L* colonies type *3B* underwent transformation into type *3A* (phot. 15).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 27 - 32

Z. Lorkiewicz, B. Marciniak i *I. Żelazna*

WPŁYW NIEKTÓRYCH CZYNNIKÓW NA POWSTAWANIE FORM *L*

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie

Zagadnienie oddziaływania różnych czynników na proces powstawania form *L* było przedmiotem badania licznych autorów, szczególnie Klieneberger-Nobel (1946), Dienesa, Weinbergera i Madoffa (1950), Silbersteina (1953) i Pulvertafta (1953). Obserwacje te jednakże, prócz Dienesa, były niewyczerpujące i poczynione zazwyczaj ubocznie przy doświadczeniach mających inne założenia.

W celu lepszego poznania biologii form *L* postanowiliśmy przebadać i wyjaśnić zależność indukcji form *L* od niektórych czynników.

Do badań własnych używaliśmy 1,5% agar z dodatkiem 25% surowicy końskiej oraz penicyliny do stężenia 2000 j./ml pożywki. Skład tego podstawowego podłoża ulegał zmianie tylko w eksperymentach nad wpływem stężenia agaru, surowicy i penicyliny. Część doświadczeń z hodowlą wgłębną wykonano na agarze 2%, gdy przekonano się, że stężenie to jest odpowiedniejsze od 1.5%. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono na preparatach Ørskova, prócz obserwacji nad wpływem wilgotności, utlenienia, temperatury, stężenia agaru oraz wieku wsiewanych bakterii, które wykonano również lub tylko w hodowli powierzchniowej na płytkach Petriego. Do wysiewu używano 18-godzinnej hodowli *Proteus vulgaris*, 3 razy przemytej w płynie fizjologicznym, zaś gęstość jej ustalano według skali Mac Farlanda. W każdej serii doświadczeń było 6 powtórzeń równoległych na preparatach Ørskova oraz 4 - 5 powtórzeń w hodowli powierzchniowej na płytkach. Poza tym każdą serię z hodowlą wgłębną powtarzano przynajmniej dwukrotnie, a niektóre — gdy wyniki były niejasne — więcej razy (serię z różnymi stężeniami surowicy i hemolizatu powtórzono 8 razy).

Postanowiliśmy najpierw przebadać powstawanie *L* form zależnie od czynników działających w normalnie używanej pożywce do tego rodzaju hodowli, więc: ilości i wieku bakterii, stężenia penicyliny i agaru, wilgotności, temperatury oraz utlenienia.

WPŁYW ILOŚCI WSIEWANYCH BAKTERII

Badania nad powstawaniem form *L* w zależności od wielkości *inoculum* bakterii wykonano w hodowli wgłębnej i powierzchniowej. Wyjątkowo w tej serii doświadczalnej hodowlę powierzchniową nastawiono na preparatach Ørskova. Do wysiewów powierzchniowych użyto 7 różnych stężeń bakterii. Ilość wsiewanych drobnoustrojów na jeden preparat wynosiła przy poszczególnych stężeniach: 10^7; $3.3 \cdot 10^6$; 10^6; $3.3 \cdot 10^5$; 10^5; $3.3 \cdot 10^4$; 10^4. Przy największym stężeniu bakterii powstała największa (średnio 928), zaś przy najmniejszym — najmniejsza (średnio 5) ilość

kolonii *L*. Spadek ilości kolonii *L* był mniej więcej proporcjonalny do zmniejszenia dawki drobnoustrojów.

Do wsiewu wgłębnego użyto 4 różne stężenia bakterii: $7{,}5 \cdot 10^4$; $7{,}5 \cdot 10^3$; $7{,}5 \cdot 10^2$ i 75 pałeczek odmieńca na jeden preparat. Tutaj również stwierdzono prawie że proporcjonalną zależność między liczbą powstałych *L* kolonii i dawką wsianych drobnoustrojów. Przy wsiewie powierzchniowym maksymalna „wydajność" kolonii *L* w jednym szeregu stężeń wynosiła 1 kolonia *L* na 1380 drobnoustrojów, zaś we wsiewie wgłębnym 1 kolonia *L* na 45 drobnoustrojów (na poszczególnych preparatach nawet 1 : 35). Przy wsiewie wgłębnym powstaje więc kilkadziesiąt, a czasami nawet stokilkadziesiąt razy więcej form *L* niż przy powierzchniowym.

Przy posiewie powierzchniowym przeważały kolonie typu *3B*. W hodowli wgłębnej trudno było zidentyfikować typy kolonii, ale swoją budową przypominały one typ *3B* bez kryz.

W dalszych doświadczeniach wsiewano zazwyczaj 7 500 bakterii na 1 preparat Ørskova oraz 300 000 na płytkę Petriego o średnicy 6 cm.

WPŁYW WIEKU WSIEWANYCH DROBNOUSTROJÓW

Do poszczególnych serii doświadczalnych użyto drobnoustrojów w jednakowej ilości, lecz różnym wieku, od 1 godziny do 5 dni. Okazało się, że najwięcej kolonii *L* powstaje z hodowli 16 - 36-godzinnej, zaś ze starszych i młodszych powstają również formy *L*, lecz w znacznie mniejszej ilości. Z kilkugodzinnej hodowli powstawały na płytkach kolonie typu *3B*, zaś z hodowli 8 - 36-godzinnych również kolonie typu *3A*.

WPŁYW STĘŻENIA AGARU

Dużą rolę w powstawaniu *L* form odgrywa stężenie agaru. Zgodnie z doświadczeniami Liebermeistera (1955) wykazaliśmy, że dla hodowli wgłębnej najodpowiedniejszy jest agar 2%, na którym powstawało około 2000 kolonii *L* na 1 preparat Ørskova, na 1,5% agarze około 1500 kolonii, na 1% kilka kolonii. Na 3% agarze powstawało około 100, zaś na 4% brak było kolonii.

W hodowli powierzchniowej stwierdzono najobfitszy wzrost na 1,5% agarze, na 1% nieco słabszy, na 2% jeszcze słabszy, zaś na 3% i 4% wzrost nie wystąpił.

Z powyższych danych wynika, że proces indukcji form *L* w mniejszym stopniu zależny jest od stężenia agaru przy posiewie wgłębnym niż powierzchniowym.

WPŁYW STĘŻENIA PENICYLINY

Ciekawe wyniki uzyskano w doświadczeniu przy użyciu różnych stężeń penicyliny. Zastosowano tutaj szeroką skalę stężeń od 0,01 do 100 000 j. penicyliny na ml pożywki. Do stężenia penicyliny 2 - j./ml wyrastały kolonie bakteryjne. Następnie przy koncentracji 10 - 20 j. penicyliny nie stwierdzano w większości doświadczeń ani kolonii bakteryjnych, ani kolonii *L*. Czasami przy tym stężeniu napotykano na niewielką ilość kolonii *L* lub bakteryjnych. Od 50 - 500 j./ml zaznaczał się stopniowy wzrost ilości form *L*.

Począwszy od stężenia penicyliny 500 - 55 000 j./ml występowała duża ilość kolonii *L*, która wahała się od kilkuset do 2000. Przy stężeniu 100 000 j. napotykano na pojedyncze rozwinięte kolonie *L*, a obok nich liczne, lecz niedojrzałe, przeźroczyste, niezabarwione kolonie.

W literaturze (Dienes i współpr. 1950, Freundt 1950) jako górną granicę, przy której otrzymuje się formy *L*, podawano stężenie penicyliny 10 000 - 16 000 j./ml. Wykazaliśmy ponad wszelką wątpliwość, że przy stężeniu 55 000 jednostek penicyliny na ml powstają jeszcze oblicie kolonie *L*, a nawet, chociaż bardzo słabo, przy stężeniu 100 000 j./ml. Warto zwrócić uwagę na koncentrację 10 - 20 j./ml, gdzie występowały tylko nieliczne kolonie. Jest to stężenie progowe, które działa bakteriobójczo lecz nie dopuszcza do powstawania kolonii *L*.

WPŁYW SUROWICY I HEMOLIZATU

Do tych doświadczeń użyto pożywki ze stężeniem 1, 5, 15 i 25% surowicy.

Największa ilość kolonii *L* powstawała przy stężeniu 25%. Różnice w wynikach były dosyć znaczne. Przy koncentracji 25% powstawało 2 - 3 razy więcej kolonii niż przy 15 i 5%, a przy 1% ilość otrzymanych kolonii była jeszcze mniejsza i niewiele przewyższała liczbę form *L* na preparatach bez surowicy.

Dodatek 1% hemolizatu krwinek końskich do agaru z surowicą lub bez surowicy powodował w niedużym stopniu zwiększenie ilości powstałych *L* form. Natomiast hemolizat w stężeniu 5% oddziaływał wyraźnie hamująco na powstawanie kolonii *L*.

WPŁYW WILGOTNOŚCI

Okazało się, że nie tylko przy zbyt wilgotnym agarze, ale również w wilgotnej atmosferze słabiej powstają formy *L*. Stwierdziliśmy, że na płytkach nieco podsuszonych powstaje kilkanaście razy więcej kolonii, niż na płytkach trzymanych w komorze wilgotnej.

WPŁYW NATLENIENIA

Duży wpływ na indukcję form *L* posiadają również warunki natlenienia. Na to wskazywały różnice w ilości powstałych kolonii w hodowli powierzchniowej oraz wgłębnej. Za tym przemawia morfologia kolonii *L*, które wrastają wgłąb agaru. W warunkach beztlenowych powstawało na płytce powyżej 4000 kolonii, natomiast w tlenowych warunkach trzystakilkadziesiąt.

WPŁYW TEMPERATURY

W dalszych eksperymentach przebadaliśmy wpływ temperatury na powstawanie kolonii *L*. Trzymaliśmy płytki i preparaty Ørskova w temperaturze 22°, 37°, 39° i 41°. Najwolniej powstawały kolonie w temperaturze pokojowej, przy tym jednakże ilość ich była największa. W hodowli powierzchniowej przy 22° powstawało 10 razy więcej kolonii, niż przy 37° i 39°, a 35 razy więcej niż przy 41°. Natomiast w hodowli wgłębnej wpływ temperatury zaznaczał się o wiele słabiej. Również i tutaj ilość kolonii *L* przy 22° była największa, ale zaledwie dwa razy większa niż przy 37° i 39°, oraz 4 razy większa w porównaniu z hodowlą przy 41°.

WPŁYW GLIKOZY

Z rzadziej stosowanych czynników przy hodowli form *L* przebadaliśmy glikozę. W odróżnieniu od wyników Kandler i Kandlera (1955) stwierdziliśmy, że kolonie *L* powstają na pożywce ze stężeniem do 4% glikozy. Zasadniczo glikoza w koncentracji 0,1% do 4% nie wpływała na ilość powstających form *L*.

Reasumując uzyskane wyniki należy podkreślić, że duży wpływ na powstawanie kolonii *L* wywiera temperatura, beztlenowe środowisko, wilgotność, stężenie penicyliny oraz stężenie agaru i surowicy.

Niezależnie od doświadczenia, na gęściej usianych preparatach kolonie *L* były mniejsze niż na preparatach z mniejszą ilością kolonii. Na brzegach preparatów kolonie były większe, niż w ich środku. Na płytkach kolonie grupowały się głównie w miejscach gdzie powierzchnia agaru była nierówna i na brzegach płytki.

LITERATURA

1. Dienes L., Weinberger H. J., Madoff S., 1950: The transformation of typhoid bacilli into *L* forms under various conditions. *J. Bact.*, **59**: 755.
2. Freundt E. A., 1950: Observations on Dienes *L* type growth of Bacteria, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **27**: 159.
3. Kandler G., Kandler O., 1955: Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an pleuropneumonieänlichen Organismen und der *L*-Phase der Bakterien. *Zentr. Bakter., II*, **108**: 383.
4. Klieneberger-Nobel E., 1949: Origin, development and significance of *L* forms in bacterial cultures., *J. Gen. Microbiol.*, **3**: 434.
5. Liebermeister K., 1955: Zur Frage der *L*-Phase von Bakterien. *Zentr. Bakter., I, Ref.*, **156**: 181.
6. Pulvertaft R.J.V., 1953: The *L* form of bacteria in relation to antibiotics. *J. Path. Bact.*, **65**: 175.
7. Silberstein J. K., 1953: Observations on the *L* forms of *Proteus* and *Salmonella*, *Schweiz. Zeitschr. Allg. Path. Bakter.*, **16**: 739.
8. Weinberger H. J., Madoff S., Dienes L., 1950: The properties of *L* forms isolated from *Salmonella* and the isolation of *L* forms from *Shigella*. *J. Bact.*, **59**: 765.

Z. Lorkiewicz, B. Marciniak and *I. Żelazna*

FACTORS INFLUENCING THE TRANSFORMATION OF *PROTEUS VULGARIS* INTO *L* FORMS

Summary

Induction of *L* transformation was investigated quantitatively.

The number of subsurface *L* colonies appearing in semisolid agar with 25% of horse serum and 2000 units of penicillin (G) per 1 ml reached 2-3 per 100 bacterial cells inoculated.

The number of surface colonies was much smaller — 7 per 10 000 bacterial cells introduced into the culture medium.

There was a good correlation between the number of *L* colonies and the number of bacterial cells in inoculum.

The number of *L* colonies depends largely on the age of the culture from which inoculum was taken. Relatively little *L* colonies appeared when young (less than 16 hours) and old (more than 36 hours) cultures were used for inoculum.

L colonies type *3A* (according to Dienes nomenclature) were received only from the inoculum not younger than 8 hours and not older than 36 hours of incubation.

Type *3A* appeared only in surface cultures.

It was shown that number of *L* colonies was influenced by the concentration of the agar. In pour-plate cultures most aboundant growth was observed in the media with 2% of agar. Nevertheless *L* forms grew in pour-plates in wide limits of concentrations of agar — from 1% to 4%.

The best surface growth was received on 1% and 1,5% agar. On 3% and 4% agar no growth could be noted.

The effect of penicillin was unexpected. Bacterial forms were resistant to 10 units per 1 ml. In concentrations of penicillin between 10 - 20 units per 1 ml no growth could be dedected neither of bacterial nor of *L* forms. From the concentration 20 units per 1 ml upwards the number of *L* colonies raised steeply reaching the maximum at the level 2000 units per 1 ml. Similar numbers of *L* colonies grew in the concentrations up to 55 000 units. Single *L* colonies were observed even in the concentration 100 000 units per 1 ml.

The serum was not indispensable as an addition to the culture medium. Type *3B L* colonies grew on the agar medium without serum.

The largest number of *L* colonies was noted in media with 25% horse serum. Serum stored for a long period in an ice-box was not suitable for culturing of *L* forms.

The horse erythrocyte haemolysate in 1% concentration stimulated the growth of *L* forms.

L forms of *Proteus*, but not of other gram-negative bacteria tested, grew aerobically, but for more abundant growth microaerophilic or anaerobic conditions were more favorable.

L forms prefered lower temperatures of growth (22°). At 22° the growth is slow but the number of *L* colonies is from twice (subsurface colonies) till ten-times (surface colonies) greater than at 37°. At 41° the growth was very poor.

The addition of glucose in the concentration range from 0,1% to 4% has no effect on the growth of *L* forms.

Tablica II

Do pracy: Sander A., Tabaczyński M. i Kwiatkowski Z. str. 21.

Fot. 1 - 9. Rozwój kolonii *L* (Obserwacja ciągła) *Proteus vulgaris*:

fot. 1. — po 3 godz. wzrostu — kolonia dużych ciał. 102 x;
fot. 2. — po 3 godz. wzrostu — kolonia dużych ciał. 425 x;
fot. 3. — po 4 godz. wzrostu — stadium wakuolizacji dużych ciał. 425;
fot. 4. — po 10 godz. wzrostu — rozpad dużych ciał. 425 x;
fot. 5. — po 12 godz. wzrostu — tworzenie elementów ziarnistych 425 x;
fot. 6. — po 16 godz. wzrostu. 425 x;
fot. 7. — po 18 godz. wzrostu — wytwarzanie młodej kolonii *L*. 602 x;
fot. 8. — po 18 godz. wzrostu — wytwarzanie młodej kolonii *L*. 425 x;
fot. 9. — rozwinięta kolonia *L* po 22 godz. wzrostu. 425 x.

Fot. 10. Kolonia *L* typu *3 A* i liczne kolonie typu *3 B* — *Proteus vulgaris* po 48 godzinach wzrostu. 425 x.
Fot. 11. 48-godzinna kolonia *L Salmonella paratyphi B*. 425 x.
Fot. 12. 48-godzinna kolonia *L* typu *3 B* i liczne kolonie typu *3 A Salmonella typhimurium*. 425 x.
Fot. 13. 48-godzinna kolonia *L* typu *3 B i 3 A Escherichia coli*. 425 x.
Fot. 14. 48-godzinna kolonia *L Vibrio cholerae*. 425 x
Fot. 15. III pasaż kolonii *L P. vulgaris* na agarze z surowicą i penicyliną. Przechodzenie kolonii typu *3 B* w kolonie typu *3 A* po 36 godzinach inkubacji. 425 x.

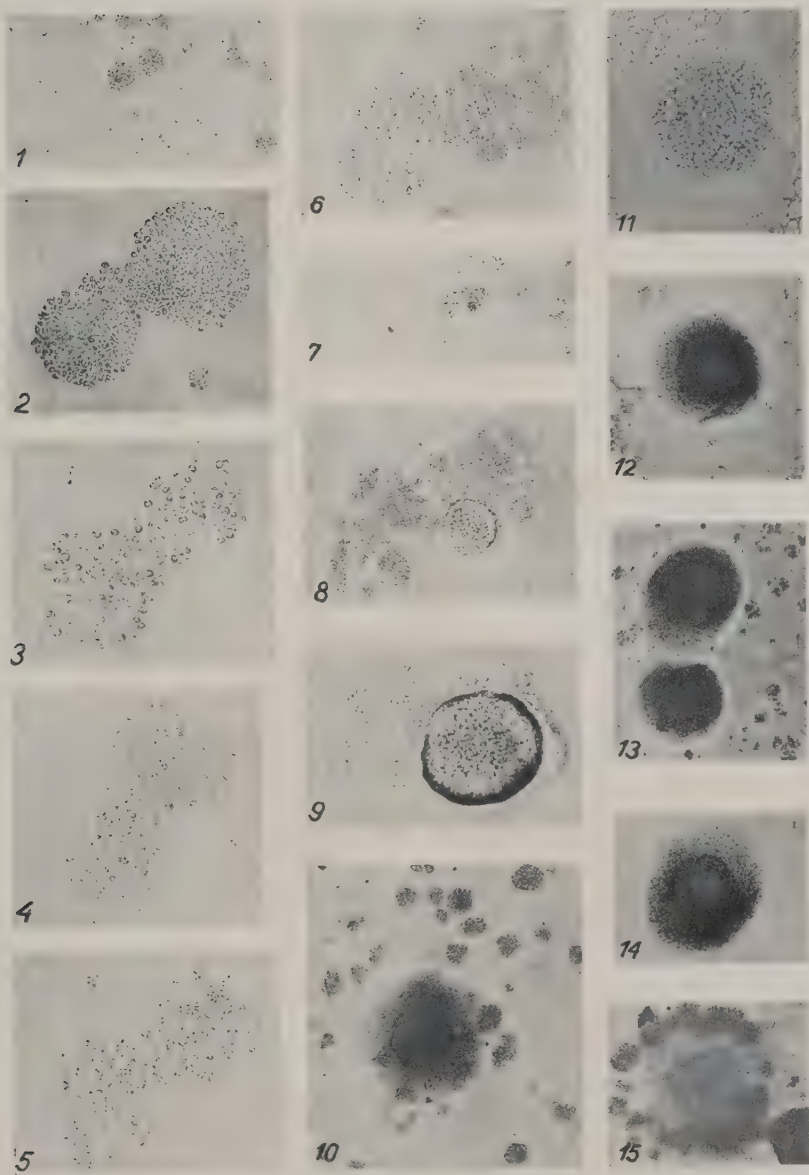
Table II

To the paper Sander, Tabaczyński and Kwiatkowski, p. 21.

Phot. 1 - 9. Development of *L* colony, *Proteus vulgaris*:

phot. 1. Incubation — 3 hours. Microcolony of large round bodies. 102 x;
phot. 2. This colony. 425 x;
phot. 3. Incubation — 4 hours. Vacuolisation of L.R.B. 425 x;
phot. 4. Incubation — 10 hours. Desintegration of L.R.B. 425 x;
phot. 5. Incubation — 12 hours. Development of elementary bodies. 425 x;
phot. 6. Incubation — 16 hours. 425 x;
phot. 7. Development of young *L* microcolony. 102 x;
phot. 8. The some object. 425 x;
phot. 9. Mature *L* colony 22 hours old. 425 x.

Phot. 10. *P. vulgaris*, Single colony *3 A* and many colonies *3 B* — 48 hours old. 425 x.
Phot. 11. *Salmonella paratyphi B*, *L* colony 48 hours old. 425 x.
Phot. 12. *Salmonella typhimurium*, *L* colonies, types *3 A* and *3 B* 48 hours old 425 x.
Phot. 13. *Escherichia coli*, *L* colonies, types *3 A* and *3 B* 48 hours old. 425 x.
Phot. 14. *Vibrio cholerae*, *L* colony 48 hours old. 425 x.
Phot. 15. *P. vulgaris*. Young colonies type *3 A* growing from the *L* colony type *3 B*; 36^{h} incubation after serial transfers on penicillin-serum-agar. 425 x


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

Tablica III

Do pracy: Sander, Tabaczyński i Kwiatkowski, str. 21

Fot. 16. Odmiana typu kolonii *3 B P. vulgaris* po 72 godz. inkubacji. Wiek inokulum — 4 godziny. 102 x.

Fot. 17. Wycinek olbrzymiej kolonii *L P. vulgaris*: 6 tygodni inkubacji. Kostka agarowa w bulionie z penicyliną zasianym pałeczkami *P. vulgaris*. 425 x.

Do pracy: Kunicki-Goldfinger, Dygdała, Łagowska i Wiercieńska, str. 33.

Fot. 1. Zwakuolizowanie „Duże ciałe" *Escherichia coli*, 24 godz. inkubacja na agarze z 2,5% LiCl. 408 x.

Fot. 2. Mikrokolonia dużych form ziarnistych *E. coli*, 72 godz. inkubacja na agarze z 2,5 % LiCl. 408 x.

Fot. 3. 10-dniowa kolonia form ziarnistych *E. coli* na agarze z 2,5% LiCl. 408 x.

Fot. 4. Duże ciała i formy ziarniste *E. coli*. Preparat odciskowy, barwiony metodą Giemsy. 1000 x.

Fot. 5. Pasaż dużych ciał na agarze z 4% LiCl. Rewersja dużych ciał do form nitkowatych. 408 x.

Fot. 6. Powstawanie form nitkowatych na brzegu kolonii dużych ciał. Agar z 4% LiCl. 408 x.

Fot. 7. Powstwanie form nitkowatych z dużych ciał. Preparat odciskowy barwiony met. Giemsy. 1000 x.

Fot. 8, 9 i 10. Kolonie form gonidialnych. 144 x.

Table III

To the paper: Sander, Tabaczyński and Kwiatkowski, p. 21

Phot. 16. *P. vulgaris*, type *3B L* colony 72 hours old, 425 x.

Phot. 17. Sector of giant *L* colony of *P. vulgaris* 6 weeks old on the agar cube in penicillin-broth. 425 x.

To the paper: Kunicki-Goldfinger, Dygdała, Łagowska and Wiercieńska, p. 33.

Phot. 1. *Escherichia coli*. Vacuolar „large bodies" 24 hours old at 22° on an agar medium containing LiCl (2,5%). 408 x.

Phot. 2. *E. coli*. Microcolony of coccoid forms 72 hours old at 22°; 2,5% LiCl. 408 x.

Phot. 3. Microcolony of coccoid forms 10 days old at 22°; 2,5% LiCl. 408 x.

Phot. 4. *E. coli*: Large bodies and coccoid forms. Giemsa stain. 1000 x.

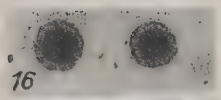
Phot. 5. *E. coli*. Reversion of large bodies into filamentous forms. Culture grown on an agar medium containing 4% LiCl and transfered to similar medium. 408 x.

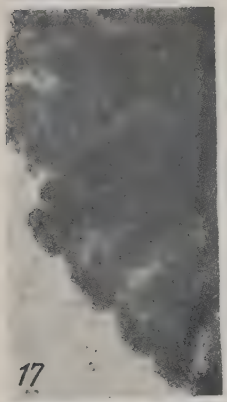
Phot. 6. *E. coli*. Microcolony of large bodies. Filamentous forms on the margin of the colony. 408 x.

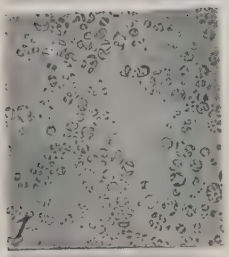
Phot. 7. *E. coli*. The filaments formed from the large body. Giemsa stain. 1000 x.

Phot. 8, 9, 10 — Microcolonies of gonidial forms. 144 x.

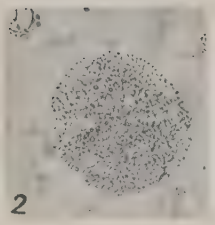
Phot. 16. *P. vulgaris*, type *3B*, α colony 72 hours old, 425 x.


16

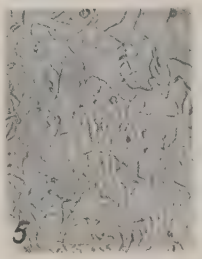

17

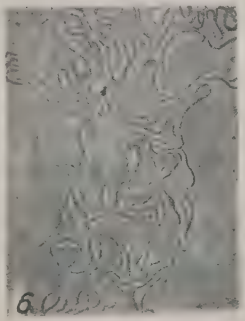

1

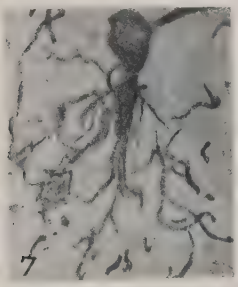
3

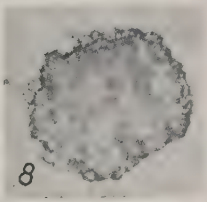

2

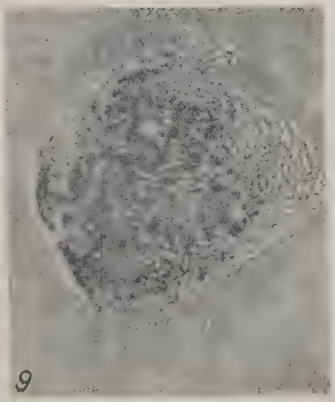
4

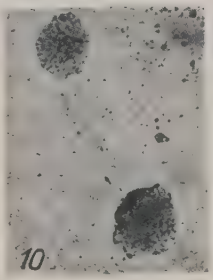

5


6


7


8


9


10

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 33 - 39

W. Kunicki-Goldfinger, K. Dygdała, M. Łagowska i *D. Wiercieńska*

WPŁYW CHLORKU LITU (LiCl) NA *ESCHERICHIA COLI* I NIEKTÓRE INNE BAKTERIE

KOMUNIKAT TYMCZASOWY

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie

Silnie modyfikujący wpływ LiCl na dyferencjację komórek oraz na morfologiczne i cytologiczne przemiany bakterii jest dobrze znany.

Powstawanie form aberacyjnych u *Vibrio* przy działaniu chlorku litu opisał pierwszy Gamaleja. Stosunkowo najwnikliwsze badania nad tym zagadnieniem pochodzą od Hadleya (Hadley 1927, 1937, Hadley, Delves i Klimek 1931), Kuhna i Sternberg (1931) oraz Preisza (1937).

Niestety ciekawe i godne uwagi wyniki tych badań zostały zawoalowane obszernymi teoretycznymi rozważaniami autorów, opierającymi się na niezupełnie uzasadnionych i nie zawsze nawet prawdopodobnych założeniach.

CEL PRACY

W pracy niniejszej staraliśmy się zbadać rodzaj zmian wywoływanych przez LiCl u *Escherichia coli* oraz niektórych innych bakterii (*Proteus vulgaris, Bacillus subtilis*). Ponadto pragnęliśmy sprawdzić realność gonidialnych form *C* opisanych przez Kuhna i Preisza, zdolność chlorku litu do pobudzania przemiany bakterii w formy *G* Hadleya. Wreszcie zamiarem naszym było zbadanie, czy następuje adaptacja do chlorku litu i o ile słuszna jest hipoteza Yudkina, starająca się wytłumaczyć mechanizm powstawania form opornych na substancje antybakteryjne.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na 8 szczepach *Proteus vulgaris*, 3 szczepach *Bacillus sp.* i 1 szczepie *Escherichia coli*. Stosowano agarowe podłoże Kuhna (Kuhn i Sternberg 1931), z tą różnicą, że zamiast wyciągu mięsnego „Lab-Lemco" użyto wyciąg z serc wołowych. *pH* podłoża nastawiano w I serii na 6,6, w II — na 7,6. W I serii dodawano do poszczególnych partii podłoża LiCl (pro analysi) w takiej ilości, aby otrzymać końcowe jego stężenie: 0,3, 0,6, 1,0, 2,5, 4,0, 5,0, 6,5 i 8,5%; w serii II — 0,5, 1, 2,5 i 4,0%. Jako kontrolę stosowano takie same podłoże bez chlorku litu. Pożywkę rozlewano do płytek Petriego tak, aby tworzyła warstwę grubości 3 mm.

Badane bakterie (świeżo wyosobnione) — hodowano na agarach skośnych. Przed eksperymentem wysiewano je na bulion odżywczy i po 3 godzinach inkubacji w 37° przenoszono przy pomocy pipety pasterowskiej na agar z chlorkiem litu.

Hodowlę prowadzono w temperaturze pokojowej i w 37°.

Obserwacji dokonywano wprost na płytce agarowej pod mikroskopem oraz w preparatach odciskowych, sporządzanych i barwionych według metody Kuhna i Sternberg (1931).

Fotografie wykonywano w kamerze mikroskopowej „Mikrophot" R.O.W. lub przy pomocy nasadki „Exacta" i mikroskopu „Lumipan" na błonach „Agfa".

WYNIKI BADAŃ

I. ZMIANY MORFOLOGICZNE POD WPŁYWEM LiCl

Wszystkie szczepy *Proteus* zachowały się na podłożach z chlorkiem litu podobnie. W środowisku słabo kwaśnym (*pH* 6,6) wzrost był obfity i makroskopowo normalny do stężenia 2,5% LiCl. Mikroskopowo stwierdzono przy mniejszych stężeniach (do 0,6% LiCl) formy krótkopałeczkowate, silnie ruchliwe. W miarę podnoszenia koncentracji LiCl pojawiały się formy wydłużone i nieco obrzmiałe.

Stężenia powyżej 4% LiCl działały hamująco na wzrost pałeczek odmieńca.

W środowisku słabo zasadowym (*pH* 7,6) nie zauważono żadnych zmian kształtu i budowy pałeczek, niezależnie od stężenia chlorku litu, z tym, że stężenia wyższe niż 4% hamowały wzrost.

Równie oporne na obecność LiCl w środowisku okazują się laseczki. Jeden z trzech badanych szczepów *Bacillus* w obecności 4% LiCl (*pH* 6,6) zaczynał prawie natychmiast wytwarzać przetrwalniki i po 4 dniach w hodowli nie znajdowano niemal zupełnie form wegetatywnych.

U *Escherichia coli* najbardziej typowe zmiany obserwowano na podłożu o *pH* 6,6 i 2,5% LiCl.

Przy hodowli w temperaturze 22° dość wolno dzielące się pałeczki (patrz niżej) zaczynały obrzmiewać i po 5 - 6 godzinach przechodziły w ciała olbrzymie. Kształt ich, zgodnie z obserwacjami Kuhna i Preisza, był bardzo różnorodny, wielkość — do kilkunastu mikronów.

Po 10 godzinach inkubacji zaczynała się wakuolizacja dużych ciał, potęgująca się coraz bardziej i doprowadzająca po dalszych 5 godzinach do fazy rozpadu. W tej fazie duże ciała — uprzednio rozmnażające się przez przeważnie niesymetryczny podział — zaczynały rozpadać się na formy drobnoziarniste. Większość z nich ulegała lizie.

Po 24 godzinach inkubacji stwierdzono zwakuolizowane duże ciała, (fot. 1, Tabl. III — po str. 32) oraz stopniowo coraz liczniejsze formy ziarniste. Po 3 - 5 dniach powstawały na powierzchni agaru kolonie szarawe, nieprzeźroczyste, o konsystencji śluzowej i ciągliwej, złożone z form ziarnistych (fot. 2 i 3, Tabl. III). Centrum takich kolonii zwykle składało się z form drobnoziarnistych, strefa brzeżna — z dużych ciał.

Treść komórkowa dużych ciał była optycznie jednorodna, silnie łamiąca światło. Na preparatach odciskowych barwionych barwikiem Giemsy (fot. 4, Tabl. III) widoczna była niekiedy piankowata budowa cytoplazmy i nieliczne, bardzo drobne ziarna chromatynowe.

Przebieg tych zmian był nieco odmienny w zależności od temperatury inkubacji i stężenia chlorku litu.

Przy stężeniu 0,5% LiCl cały proces przemian, zachodzący podobnie, był znacznie zwolniony — np. ciała olbrzymie powstawały dopiero po 14 godzinach.

Na podłożu z 4% LiCl proces obrzmiewania pałeczek przebiegał odmiennie. Zgrubienie pojawiło się w środkowej części nieco wydłużonej pałeczki, wskutek czego bakteria przybierała postać rogala, kapelusza napoleońskiego lub trójkąta. Większość takich form ulegała lizie, a nieliczne wytwarzały postacie ziarniste, nie przechodząc przez stadium wakuolizacji.

Zasadniczym czynnikiem decydującym o kierunku przemian była jednak ciepłota. W temperaturze 22° formy drobnoziarniste i duże ciała dawały się pasażować na podłożu z LiCl bez zmian. Natomiast w ciepłocie 37° rewersja do form pałeczkowatych zaczynała się już po 24 godzinach inkubacji w obecności 2,5% LiCl, a po 3 dniach obejmowała całą kolonię.

Ciała olbrzymie i formy ziarniste dawały się pasażować zarówno na podłoża bezlitowe, jak i na zawierające LiCl. Pasaże wykonywano za pomocą wyciętych bloczków agarowych lub przez spłukanie kolonii form ziarnistych.

Przemiany, jakim ulegają bakterie w dalszych pasażach, uwidocznione są w tabeli I.

Widoczne jest, że podwyższona ciepłota sprzyja rewersji.

Bardzo charakterystyczne są formy nitkowate powstające przy rewersji, szczególnie łatwo na podłożu z 4% LiCl (fot. 5 i 6, Tabl. III). Formy nitkowate mogą powstawać z form ziarnistych lub też wprost z dużych ciał, przy czym z jednego dużego ciała może powstać pęk nitek (fot. 7, Tabl. III). Ciekawe jest to, że rewersja zachodząca w temperaturze 22° prowadzi do wytworzenia kolonii fazy *R*, zaś rewersja w 37°, przebiegająca poprzez stadium form nitkowatych, daje kolonie fazy *S*.

Formy pałeczkowate otrzymane z rewersji zachowują swe własności biochemiczne oraz są nadal wrażliwe na obecność LiCl. Nie zachodzi tu więc zjawisko adaptacji. Należy jednak zaznaczyć, że pałeczki otrzymane z rewersji, zarówno w fazie *S* jak i w *R*, zachowują się nieco odmiennie niż szczep macierzysty w obecności LiCl.

Badania powyższe potwierdziły zasadniczo wyniki Kuhna i Preisza odnośnie zmienności morfologicznej pałeczki okrężnicy pod wpływem litu.

Nie udało się jednak potwierdzić ich obserwacji nad powstawaniem kolonii *C*. Kolonie dużych ciał i form ziarnistych niezupełnie odpowiadają opisowi kolonii *C*, podanemu przez Kuhna. Znalezione przez nas kolonie są większe, bardziej przejrzyste i złożone są z nieco innych elementów niż kolonie *C*. Ponadto kolonie te przy przesiewie na podłoża nie zawierające LiCl ulegają rewersji, podczas gdy faza *C* Kuhna miała być ustalona.

Znajdowaliśmy wprawdzie niekiedy małe kolonie makro- i mikroskopowo zupełnie odpowiadające koloniom *C*, ale po sprawdzeniu zawsze okazywały się one koloniami jakiegoś ziarniaka rosnącego w obecności LiCl.

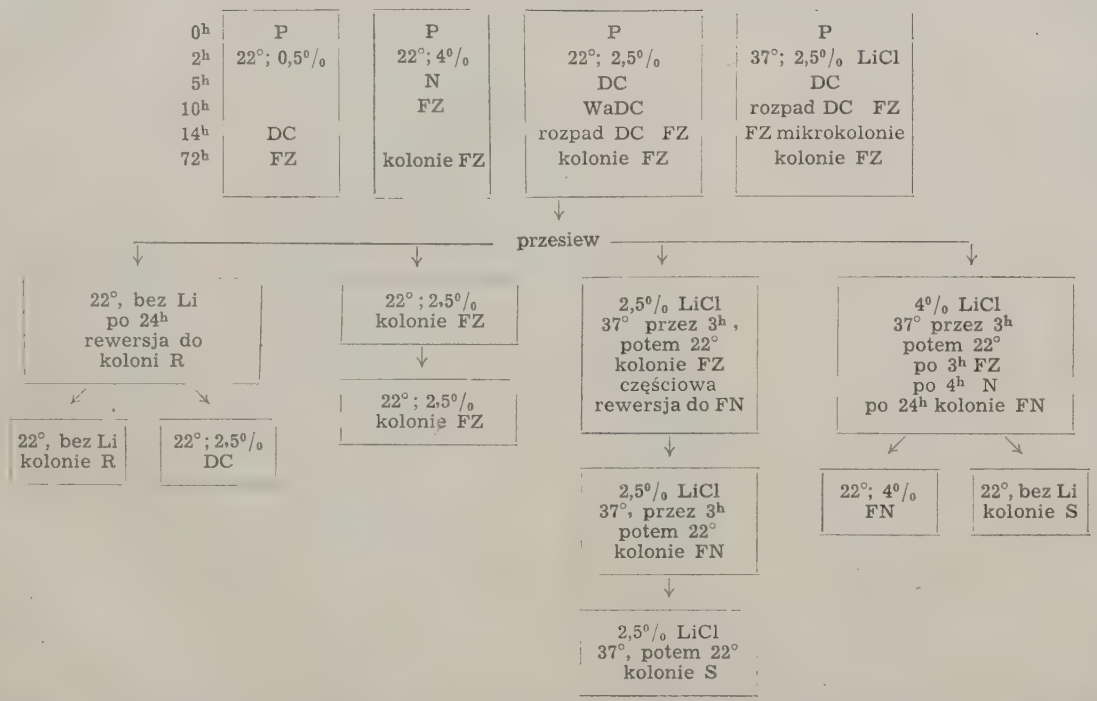
Należy zaznaczyć, że indukcję kolonii *C* starano się osiągnąć przy użyciu wielu przeważnie świeżo wyosobnionych szczepów *E. coli*, zarówno przy pomocy LiCl jak i amioniaku (patrz Kunicki-Goldfinger i współpr. 1956), zawsze z negatywnym wynikiem.

Wydaje się więc, że kolonie *C* Kuhna były albo artefaktem, albo też formami gonidialnymi powstającymi niezależnie od obecności LiCl.

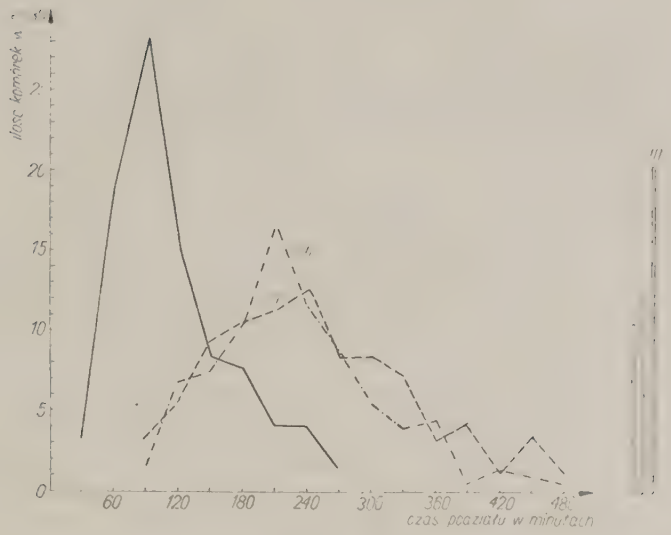
Badania te są nadal kontynuowane.

Tabela I

Przemiany *E. coli* pod wpływem LiCl

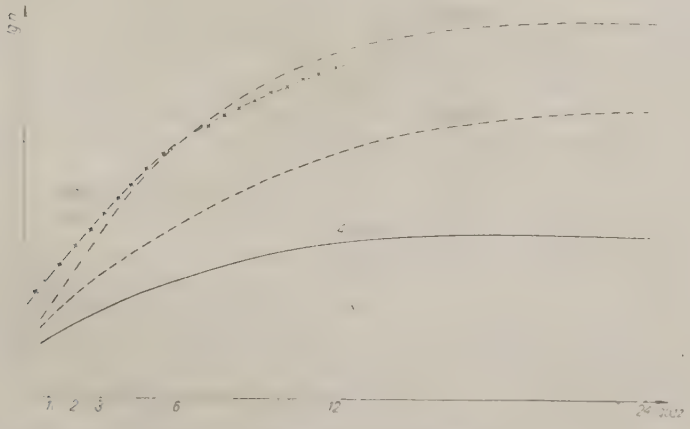

0h
2h
5h
10h
14h
72h
P
22°; 0,5% DC FZ
P
22°; 4% N FZ kolonie FZ
P
22°; 2,5% DC WaDC rozpad DC FZ kolonie FZ
P
37°; 2,5% LiCl DC rozpad DC FZ FZ mikrokolonie kolonie FZ
przesiew
22°, bez Li po 24h rewersja do koloni R
22°, bez Li kolonie R
22°; 2,5% DC
22°; 2,5% kolonie FZ
22°; 2,5% kolonie FZ
2,5% LiCl 37° przez 3h, potem 22° kolonie FZ częściowa rewersja do FN
2,5% LiCl 37°, przez 3h potem 22° kolonie FN
2,5% LiCl 37°, potem 22° kolonie S
4% LiCl 37° przez 3h potem 22° po 3h FZ po 4h N po 24h kolonie FN
22°; 4% FN
22°, bez Li kolonie S

Objaśnienia: strzałki oznaczają przesiewy, P — normalne pałeczki, DC — duże ciała, Wa DC — zwakuolizowane duże ciała, FZ — formy ziarniste, N — formy „kapelusze Napoleona", FN — formy nitkowate (patrz fot. 5 i 6, Tabl. III).



Rys. 1. Szybkość podziału komórek I, II i III pokolenia *Escherichia coli* na agarze z 2,5% LiCl

Fig. 1. Growth rate of three generations of cells of *Escherichia coli* on an agar medium containing 2,5% LiCl



Rys. 2. Wpływ LiCl na szybkość wzrostu *E. coli* na agarze

Fig. 2. Effect of LiCl on the growth of *E. coli* on an agar medium

II. WPŁYW CHLORKU LITU NA WZROST *E. coli* I MOŻLIWOŚĆ ADAPTACJI

W pierwszej części pracy stwierdzono, że u *E. coli* nie występuje trwała adaptacja do LiCl.

Stwierdzono równocześnie, że wrażliwość poszczególnych osobników jest bardzo różna — podczas gdy jedne ulegają rozpadowi i obumarciu już po kilku godzinach, inne zachowują żywotność i jako formy ziarniste dają się pasażować wielokrotnie na podłożach z LiCl.

Należałoby zatem zbadać, czy mamy do czynienia z prostą selekcją osobników już uprzednio opornych, czy też jest to oporność klonalna.

W pierwszym rzędzie zbadano wpływ LiCl na wzrost *E. coli*.

Zastosowano przy tym metodę odmienną od zwykle stosowanej. Hodowle prowadzono na podłożu agarowym (o składzie podanym w cz. I) z różnymi stężeniami LiCl. Szybkość wzrostu mierzono w ten sposób, że liczono od momentu wysiewu co pół godziny, a następnie co godzinę, po 500 skupień bakterii na powierzchni agaru, oznaczając jednocześnie ilość osobników w skupieniach i obliczając średnią ich ilość na 1 skupienie. Z chwilą gdy wytworzyły się mikrokolonie i liczenie było utrudnione, mierzono średnice mikrokolonii i obliczano ilość bakterii przypadającą na danej wielkości mikrokolonię.

Metodą tą szybkość wzrostu można było dość dokładnie mierzyć, aż do momentu powstawania dwuwarstwowych kolonii. Badanie powtarzano w kilku seriach.

Do wysiewów używano hodowli w fazie logarytmicznej wzrostu.

Wyniki ilustruje rysunek 2. Widoczne jest znaczne zahamowanie wzrostu, szczególnie przy większych stężeniach chlorku litu. Zahamowanie to nie wynikało z przedłużania fazy zastoju (lag), lecz ze skórcenia fazy logarytmicznej i znacznie wcześniejszego przejścia w fazę stacjonarną. Mechanizm hamowania zdaje się być zgoła różny od przykładów podawanych przez Hinshelwooda (1946), gdzie hamowanie powodowane było przez przedłużanie fazy zastoju.

Z kolei przystąpiono do badania szybkości podziałów indywidualnych komórek.

W tym celu obserwowano w ciągu 12 godzin po 200 komórek na podłożach: bez litu, z 2,5% LiCl i z 4% LiCl, notując czas podziału 4 pokoleń. Na rysunku 1 podane są krzywe czasu podziału 3 pokoleń *E. coli* na podłożu z 2,5% LiCl.

Stwierdzono przy tym *, że szybkość podziału nie jest cechą przekazywaną dziedzicznie. Potomstwo komórek szybko dzielących się częstokroć dzieliło się wolniej niż pochodne komórki powstałe z osobnika dzielącego się bardzo wolno.

Jednocześnie wykazano, że stężenia LiCl do 4,0% opóźniają tylko nieznacznie pierwszy podział, natomiast dalsze podziały są opóźniane tym bardziej im wyższa jest koncentracja chlorku litu.

Zwolnienie wzrostu wynika przede wszystkim z zupełnego zahamowania podziału części populacji komórek, przy czym zahamowanie to obejmuje tym większy odsetek osobników, im wyższe jest stężenie LiCl.

Przekonano się wreszcie, że wrażliwość na LiCl mierzona jako przedłużenie czasu podziału również nie jest cechą przekazywaną dziedzicznie.

Uwidacznia to tabela II, na której pokazano przykładowo czasy podziałów 2 komórek i ich potomstwa na agarze z 2,5% LiCl.

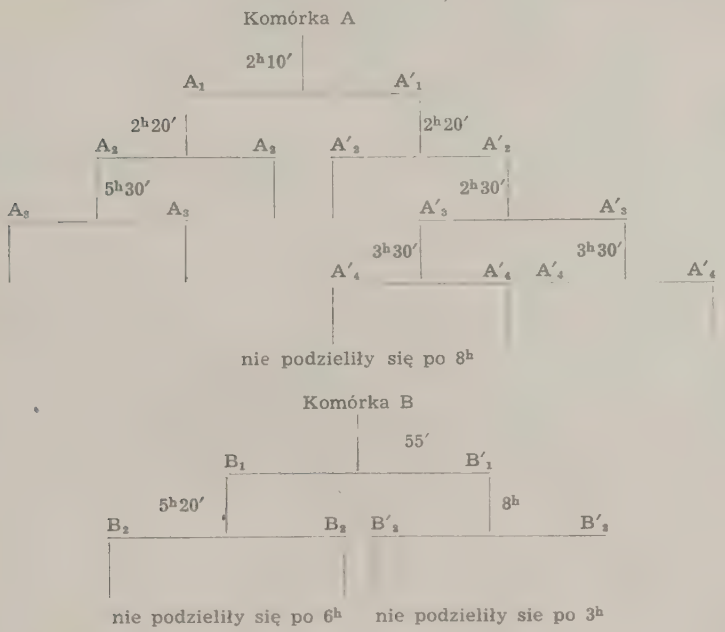
Ogólne wyniki badań części II można ująć następująco: Wydaje się, że chlorek litu: 1) hamuje przede wszystkim pierwszą fazę procesu po-

* Pełne sprawozdanie zostanie ogłoszone w późniejszym terminie.

działowego, 2) hamowanie to jest często zupełne, co prowadzi do zupełnego wstrzymania podziałów części osobników, 3) skraca fazę logarytmiczną wzrostu. Oporność na LiCl zdaje się być cechą indywidualną, zależną od aktualnego stanu fizjologicznego osobnika i nie przekazywaną dziedzicznie nawet na najbliższe, potomne komórki. Przy podziale powstają komórki nierównocenne fizjologicznie (różna oporność na LiCl), lecz nierównocenność ta nie ma charakteru dziedzicznej właściwości.

Tabela II

Szybkość podziału 2 komórek *E. coli* i ich potomstwa



LITERATURA

1. Hadley P., 1927: *J. inf. Dis.*, **40**:1.
3. Hadley P., Delves S. a. Klimek J., 1931: *J. inf. Dis.*, **48**:1.
3. Hadley P., 1937: *J. inf. Dis.*, **60**:129.
4. Hinshelwood C. N., 1946: The Chemical kinetics of bacterial cell, Oxford Univ. Press, London.
5. Kuhn Ph. u. Sternberg K., 1931: *Zentr. Bakter. I, Orig.*, **121**: 113.
6. Kunicki-Goldfinger W., Dygdała K., Łagowska M. i Wiercieńska D., 1956, *Acta Microbiol. Polon.*, **5**: 41.
7. Preisz H. V., 1937: *Zentr. Bakter., I, Orig.*, **139**: 225.
8. Yudkin J., 1938, *Biol. Rev.* **13**:93.

W. Kunicki-Goldfinger, K. Dygdała, M. Łagowska and *D. Wiercieńska*

THE EFFECT OF LiCl ON SOME BACTERIA, ESPECIALLY *ESCHERICHIA COLI*

Summary

I. All tested strains of *Proteus* were resistant to 2,5% of lithium chloride. The concentration above 2,5% inhibited the growth but no abnormal forms could be dedected.

Bacillus was not inhibited in the concentrations of LiCl smaller than 4%. Lithium chloride in the concentration 4% stimulated the sporulation in one of tested strains.

Most prominent changes were observed in *Escherichia coli.*

In the presence of LiCl *E. coli* produces enlarged, swollen cells resembling „plasmoptysis figures" observed in this bacteria by Knaysi (1949).

These „large bodies" were capable of reproduction. Their development on agar plates was observed by authors (Table III, phot. 1 - 3). They underwent fragmentation into small cells.

The transformation of bacterial cells into large bodies and later into small, coccoidal forms was observed only at 22°C and in the presence of LiCl in concentration 2,5%. When transferred to medium without LiCl at 22°C coccoidal forms grew into *R* type bacterial cells.

At 37°C — the reversion to bacterial forms was noted even on media containing LiCl.

LiCl in concentration of 4% induced production of filaments or swollen filamentous forms (Table III, phot. 4 - 7) which underwent the fragmentation into bacteria of *S* type.

II. There was no prolongation of lag-phase of growth on media containing LiCl.

The logarythmic phase of growth was shortened proportionally to the concentration of lithium chloride (Fig. 2).

The influence of LiCl upon the cell division of four consecutive generations on the surface of agar-medium was also studied (Fig. 1.).

The authors' conclusion is that: LiCl inhibits the first stadium of cell division process, influences the logarythmic phase of growth. The formation of large bodies and other aberrant forms should not be interpreted as the effect of a change in osmotic pressure. According to authors' opinion this phenomenon is due to the action of lithium cation.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 41 - 43

W. Kunicki-Goldfinger, K. Dygdała, M. Łagowska i *D. Wiercieńska*

FORMY GONIDIALNE BAKTERII

KOMUNIKAT TYMCZASOWY

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie

Formy gonidialne bakterii opisywano wielokrotnie. Bardziej wnikliwe studia poświęcili temu zagadnieniu Hadley (1927, 1937), Hadley, Delves i Klimek (1931) oraz Houduroy (1954).

Nasze badania nad formami *L* odkrytymi przez Klieneberger (1935) i Dienesa (1941) nie pozwalają jeszcze zorientować się, jaki stosunek zachodzi między tymi dwoma typami form.

Punktem wyjścia obecnej pracy była obserwacja dokonana w czasie badań nad mikroflorą jelitową *Micromammalia* w Zakładzie Badania Ssaków w Białowieży.

W pewnych przypadkach w wysiewach treści jelitowej na podłoże agarowe znajdowano bardzo małą ilość kolonii bakteryjnych. Przy bliższym zbadaniu płytek pod mikroskopem stwierdzono dużą ilość drobniutkich mikrokolonii, składających się z form ziarenkowatych wielkości ca 0,2 μ, słabo barwiących się barwikami anilinowymi.

Hodowlę tych form prowadzono metodą Houduroy naprzemiennych wysiewów na bulion i agar. Stwierdzono przy tym, zgodnie z obserwacjami Hadleya i Houduroy, że po szeregu pasaży „jałowych" może nastąpić wzrost mikrokolonii form gonidialnych, z kolei może znów nastąpić seria „jałowych" pasaży, a potem ponownie pojawia się wzrost.

Kształt i wygląd mikrokolonii widoczne są na fot. 8, 9 i 10 (Tabl. III). W miarę dalszych przesiewów kolonie stają się coraz większe; jednocześnie w wysiewach bulionowych pojawia się lekka opalescencja. Niekiedy opalescencja taka stopniowo nasila się coraz bardziej z każdym następnym pasażem, aby wreszcie przejść we wzrost bakteryjny.

W przypadkach przez nas obserwowanych otrzymywano wzrost ziarenkowatych dyfteroidów, tworzących na agarze kolonie zewnętrznie podobne do kolonii paciorkowców. W bulionie tworzyły one umiarkowany męt i zbity, ciągliwy osad.

Przejście form gonidialnych w bakteryjne uwidacznia się w obrazie mikroskopowym zwiększeniem rozmiarów elementów ziarnistych. Przy obserwacji przyżyciowej w mikroskopie kontrastowo-fazowym widać, jak w początkowo jednorodnej zawiesinie składającej się z elementów ziarnistych — od granicy widzialności do ca 0,3 μ — ułożonych w nieregularne grupki i łańcuszki, następuje różnicowanie. Z czasem pojawia się

coraz więcej form większych (0,3 - 0,5 μ), a potem nieregularnie pałeczkowatych (0,5 - 1 - 1,5 μ). Formy najmniejsze występują zwykle w tym samym łańcuszku lub zgrupowaniu obok większych i największych. Ilość form małych stopniowo maleje aż do ich zupełnego zaniku.

Przemiana formy gonidialnej w postać bakteryjną jest niestety dotychczas zjawiskiem przez nas niekontrolowanym, w tym znaczeniu, że nie znamy natury czynników indukujących taką przemianę.

Genetyczny związek formy gonidialnej i otrzymanej z niej dyfteroidalnej postaci bakteryjnej nie ulega wątpliwości, mimo że dotychczas nie udało się eksperymentalnie uzyskać przemiany odwrotnej — dyfteroidów w formy gonidialne.

Świadczy o tym zarówno identyczność otrzymywanych z tego samego materiału wyjściowego dyfteroidów w ciągu badań, trwających od 1952 roku, jak i negatywne wyniki badań kontrolnych. W kontrolnych dziesięciu seriach, niezasianych materiałem wyjściowym, dokonywano takich samych pasaży przemiennych, przy czym nigdy nie otrzymano wzrostu ani form gonidialnych, ani podobnych dyfteroidów.

Formy gonidialne rosną tak samo na podłożach wzbogaconych surowicą, krwią, hydrolizatem enzymatycznym kazeiny, wyciągiem drożdżowym, wyciągiem wątrobowym, wyciągiem z jelit gryzoni, żółtkiem jaja kurzego. Również bez wpływu pozostaje zmniejszenie cząstkowego ciśnienia tlenu.

Formy te są morfologicznie odmienne od postaci *L*, przede wszystkim brakiem ciał olbrzymich i wrażliwością na penicylinę.

Żywotność form gonidialnych jest bardzo duża — w bulionie oraz wysuszone w zwykły sposób pozostają żywe przez okres 2 lat.

Starano się otrzymać podobne formy gonidialne z gramujemnych pałeczek (*Schigella, Proteus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium*), działając na nie chlorkiem litu, amoniakiem (wg Kuhna i Sternberg 1931), zalkalizowaniem podłoża (Hadley) oraz pozostawiając hodowle bakteryjne przez długi czas w ciepłocie pokojowej. Wyniki wszystkich tych prób dotychczas okazują się płone.

LITERATURA

1. Dienes L., 1941: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **47**:385.
2. Hadley P., 1927; J. *inf. Dis.*, **40**:1, 1937; ibid. **60**:129.
3. Hadley P., Delves S. a. Klimek J., 1931, *J. inf., Dis.*, **48**:1.
4. Houduroy P., 1954: *Ann. Inst. Pasteur.*, **86**:395.
5. Klieneberger E., 1935: *J. Path. Bact.*, **40**:93.
6. Kuhn Ph. u. Sternberg K., 1931: *Zentr. Bakter., I, Orig.*, **121**:113.

W. Kunicki-Goldfinger, K. Dygdała, M. Łagowska and *D. Wiercieńska*

GONIDIAL FORMS OF BACTERIA

Summary

The gonidial forms were isolated from intestinal contents of Micromammalia (small rodents and Insectivora). They were cultured and transferred according to Houduroy's method.

Microcolonies (Table III. phot. 8 - 10) were received on nutrient agar; addition of serum, yeast extract, liver extract, casein hydrolysate, blood and sterile intestinal fluid had no effect on the growth of these forms.

The liquid broth cultures were slightly opalescent.

The elementary bodies were not greater than 0,3 μ in diameter.

After various number of transferrs the elementary bodies grew larger.

This development resulted in the transformation of gonidial forms into dyphteroids not yet identified.

The same bacterial form was received many times, independently during about four years, from the original sample.

Many controls excluded the infection with air contaminants.

The gonidial forms are susceptible to penicillin.

They are very resistant to desiccation and can be stored in plain broth for a long period (two years) in the viable state.

The researches on these forms are continued.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 45 - 49

J. Parnas

PRÓBY DOŚWIADCZALNEGO PRZEOBRAŻENIA CECH ODMIAN PAŁECZEK *BRUCELLA*

DONIESIENIE I

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego AM w Lublinie

Bakterie, a zwłaszcza pałeczki gramujemne, można doprowadzić do różnego rodzaju przeobrażenia cech przez hodowanie w środowisku zawierającym metabolity innych odmian tego samego gatunku lub nawet innych gatunków. Doświadczenie udaje się szybciej, jeśli zmusić bakterie do korzystania ze substratu zawierającego metabolity innej odmiany jako jedynego źródła azotu.

Metoda ta stosowana była już dawno, zarówno za granicą jak i u nas. Tą metodą udawało się uzyskać przejście jednych odmian pałeczek *Salmonella* w inne; udało się to również z pałeczkami *Shigella, E. coli* itp.

Burnet zwrócił uwagę na zmienność pałeczek *Brucella*, uważając je za gatunek bardzo plastyczny i wyposażony w duże możliwości przystosowawcze w różnych warunkach bytowania. Podkreśla ten pogląd również Zdrodowski (1954). Szczególne znaczenie ma możliwość wzajemnego przechodzenia odmian *Brucella* i powstawanie szczepów bardziej zjadliwych dla człowieka, na skutek wędrowania (migracji) z jednych gatunków zwierząt na drugie i na ludzi.

Zdrodowski i Juśkowiec (1954) uważają, że odmiana *melitensis* jest genetycznie związana z odmianą *bovis* i pochodzi od niej, zmieniwszy się po przejściu z ustroju bydła na małe przeżuwacze. Czasem spotykamy szczepy odmiany *melitensis* znajdujące się jakby na drodze do kształtowania się, wykazujące jeszcze cechy zbliżone do właściwości odmiany *bovis*. Takie szczepy można przyjmować za pośrednie między odmianą *melitensis* i *bovis* i znajdujące się na drodze transformacji zachodzącej w przyrodzie.

Wykonano również próby doświadczalnego przeobrażenia szczepów *Brucella*. Ciekawe doświadczenie, zmierzające do przeobrażenia odmian *Brucella*, wykonał Lisbonne (1952). Hodując różne odmiany w rurce Aszeszofa, np. odmianę *melitensis* i *suis*, zauważył, że odmiana *melitensis* zaczęła tworzyć H_2S. Odmiana *bovis* hodowana z *melitensis* zaczęła rosnąć na tioninie i przestała tworzyć H_2S. Pasażowanie odmiany *bovis* przez owce ma upodabniać je coraz bardziej do odmiany *melitensis*. Renoux i Lisbonne przypuszczają, że szczepy potencjalnie posiadają wiele cech, ujawniających się zależnie od warunków środowiska.

Niniejsze doniesienie dotyczy prób przeobrażenia cech odmian *Brucella*. Próby te zapoczątkowaliśmy w r. 1945 (Rydzak, Parnas). Polegały one wówczas na tym, że szczep odmiany *bovis* hodowaliśmy w długich pasażach na podłożu, zawierającym metabolity *Proteus* OX_{19} i odwrotnie. Próby te doprowadziły do uzyskania szczepu *Brucella*, który ulegał aglutynacji pod wpływem surowicy anty-*Proteus* OX_{19} i odwrotnie,

szczepu *Proteus* OX_{19}, który ulegał aglutynacji pod wpływem surowic anty-*Brucella*. Zastosowanie odczynu krzyżowego wysycania aglutynin według Castellaniego potwierdziło to zjawisko. Przeobrażenie cech szczepów dotyczyło również ich własności alergenowych.

Zmieniony szczep *Proteus* OX_{19} został wykorzystany dla wytworzenia alergenu, który wywołał dodatni odczyn alergiczno-skórny Burneta u królików zakażonych brucelozą.

Po zbadaniu własnej kolekcji krajowych (125) i zagranicznych (20) szczepów *Brucella* (Chodkowski, Parnas 1955) ustalono, że występują wśród nich następujące odmiany: typowa *bovis*, typowa *suis*, typowa *melitensis*, atypowa *bovis*, atypowa *suis*, atypowa *melitensis*.

Badania te stały się punktem wyjścia dla prób nad doświadczalnym przeobrażeniem cech odmian *Brucella*.

Do prób użyto 3 szczepy *Brucella*: Nr *106* typowej odmiany *melitensis*, Nr *81* typowej odmiany *suis*, Nr *24* typowej odmiany *bovis*.

Cechy charakterystyczne tych szczepów przedstawia tabela I.

Tabela I

Własności badanych szczepów *Brucella*

Некоторые свойства штаммов *Brucella*

Nr szczepu штамм №	Rozkład mocznika (minuty) Разлагание мочевины (сутки)	Wytwarzanie H_2S dzień Образование H_2S — сутки					Bakteriostatyczne działanie Бактериостатическое действие		Analiza receptorów przy pomocy surowic jednoswoistych Анализ рецепторов моновалентной сывороткой	
		I	II	III	IV	V	fuksyny zasadow. фуксина щелоч.	tioniny тионина	anty-*bovis*	anty *melitensis*
106 odm. *melitensis*	65	0	0	0	0	0	+++	+++	0	+++
81 odm. *suis*	3	+++	+++	+++	++	+	0	++	+++	0
24 odm. *bovis*	55	+++	+	0	0	0	+++	0	+++	0

Określone w ten sposób odmiany poddano próbom przeobrażenia cech wg następującej metody:

a) Uzyskanie substratu: Każdy z 3 szczepów hodowano na podłożu Huddlesona we flaszkach Roux w ciągu 3 dni. Przed wysiewem na flaszki Roux kontrolowano czystość fazy *S* przy pomocy metody Henry'ego w naszej modyfikacji (Chodkowski, Parnas), metody Brauna i metody Burneta. Jak wiadomo, domieszki fazy *R* lub faz pośrednich *I* wpływają na zmianę właściwości biochemicznych lub serologicznych szczepu. Po 3 dniach wzrostu w cieplarce (37°) sporządzano zawiesinę o gęstości równej około $20 \cdot 10^7$ komórek w 1 ml (wg skali Browna). Zawiesinę pałeczek w roztworze fizjologicznym 3–4-krotnie płukano i odwirowywano celem usunięcia śladów podłoża. Następnie zawiesinę pałeczek *Brucella* trzech odmian wzorcowych rozbijano w aparacie ultradźwiękowym o mocy 2800 kc/sek w ciągu około 90 minut w ciepłocie nie przekraczającej 30°. Stan rozbicia komórek kontrolowano w mikroskopie elektronowym PZH (A. Feltynowski). Materiał otrzymany po rozbiciu pałeczek i ogrzaniu go do ciepłoty 60° w ciągu 30 minut używano jako substrat. Podłoża takie rozcieńczano do gęstości zawiesiny, równej około 1.5 miliarda bakterii i badano orientacyjnie własności chemiczne *.

* Część chemiczną pracy wykonał T. Mierzejewski.

Wyniki podajemy poniżej:

Próba biuretowa Piotrowskiego	+
Próba Hellera	–
Próba ksantoproteinowa	+
Próba Molischa	+
Próba Fehlinga	–

Ilość N wyniosła około 0,0007 g/ml.

Aby określić cechy antygenowe substratów użyto ich w rozcieńczeniu odpowiadającym gęstości $1{,}5 \cdot 10^9$ ml jako antygenu do odczynu wiązania dopełniacza. Zahamowanie hemolizy występowało przy użyciu 3% roztworu substratu.

b) Hodowle krzyżowe *Brucella* na podłożach zawierających metabolity innych odmian. Podłoża rozlano jałowo do małych probówek w ilości po 1 ml. Do tak przygotowanych podłoży wysiewano zawiesiny *Brucella* wg następującego porządku:

I — szczep *PD* na podłożu z odmiany *bovis* (Nr *24*) — 25 pasaży *,
II — odmiana *suis* (Nr *81*) na podłożu z odmiany *melitensis* (Nr *106*)—25 pasaży,
III — odmiana *suis* (Nr *81*) na podłożu z odmiany *melitensis* (Nr *106*)—25 pasaży,
IV — odmiana *suis* (Nr *81*) na podłożu z odmiany *bovis* (Nr *24*) — 15 pasaży,
V — odmiana *bovis* (Nr *24*) na podłożu z odmiany *suis* (Nr *81*) — 25 pasaży,
VI — odmiana *suis* (Nr *81*) na podłożu z odmiany *melitensis* (Nr *106*)—14 pasaży,
VII — odmiana *bovis* (Nr *24*) na podłożu z odmiany *suis* (Nr *81*) — 14 pasaży,
VIII — odmiana *suis* (Nr *81*) na podłożu z odmiany S_{19} — 25 pasaży **,
IX — odmiana *melitensis* (Nr *106*) na podłożu z odmiany *suis* (Nr *81*)—25 pasaży,
X — odmiana *melitensis* (Nr *106*) na podłożu z odmiany *suis* (Nr *81*)—25 pasaży.

Każdy pasaż przetrzymywano w ciągu 3 - 4 dni w cieplarce, 3 - 4 dni w cieplocie pokojowej, po czym przesiewano na płytki Petriego z podłożem AGS (agar-glikoza-surowica końska), kontrolowano przy tym ponownie czystość fazy *S*. Zjawiające się kolonie fazy *R* usuwano, zaś kolonie fazy *S* przenoszono znowu na odpowiednie podłoża.

c) Po 14 - 25 pasażach wykonano próby dla określenia odmian według metodyki stosowanej przez nas (Chodkowski, Parnas 1955). Wyniki tych prób przedstawione są w tabeli II.

Jak widać z tabeli, u niektórych szczepów pasażowanych na substratach zawierających heterologiczne metabolity, ulegają zmianie takie właściwości jak aktywność ureazy, zdolność do tworzenia H_2S, wrazliwość na barwiki. Zauważyć można przy tym ciekawy fakt dominacji odmiany *suis* nad odmianami *bovis* i *melitensis*.

Następnie przystąpiono do analizy receptorów przy użyciu surowic swoistych, uzyskanych według metody stosowanej przez nas (Chodkowski, Parnas 1955).

Szczepy wzorcowe odmiany *melitensis* (Nr *106*), *bovis* (Nr *24*) i *suis* (Nr *81*) były zlepiane przez surowice swoiste anty-*bovis* i anty-*melitensis* w następujących mianach:

Nr szczepu	Surowica	Miano	
160	anty-*melitensis*	1/400	++
	anty-*bovis*	1/50	+
24	anty-*melitensis*	1/50	+
	anty-*bovis*	1/400	+
81	anty-*melitensis*	1/50	+
	anty-*bovis*	1/400	+

* Odmiana *PD* — własny szczep *bovis*, niezjadliwy.

** Odmiana S_{19} pochodzi z USA (szczep do wytwarzania niezjadliwej szczepionki).

Tabela II

Własności szczepów pasażowanych na podłożach sporządzonych z innych odmian *Brucella*

Свойства штаммов *Brucella* после культивирования на субстратах, содержащих метаболиты других штаммов

Nr szczepu Штамм №	Ureaza Уреаза		H_2S					Właściwości bakteriostatyczne Бактериостатические свойства		Odmianowe określenie szczepu Определение варианта штамма
			dzień — сутки							
	metoda Nesslera метод Несслера	czerwień fenolowa феноловая красная	I	II	III	IV	V	fuksyna zasadowa фуксин щелочный	tionina тионина	
I	4′ +++	2′ +++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	atypowe *suis*
II	3′ +++	2′ +	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	typowe *suis*
III	25′ +++	29′ +	0	0	0	0	0	+++	+++	atypowe *bovis*
IV	25′ +	29′ +	0	0	0	0	0	+++	0	typowe *bovis*
V	3′ ++	2′ +	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	typowe *suis*
VI	3′ +++	2′ ++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	typowe *suis*
VII	3′ +++	2′ ++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	typowe *suis*
VIII	3′ +++	2′ ++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	typowe *suis*
IX	3′ ++	2′ ++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++	typowe *suis*
X	25′ ++	29′ ++	0	0	0	0	0	+++	0	atypowe *bovis*

Z kolei wykonano odczyny zlepne z tymi samymi surowicami i szczepami I - X uzyskanymi przez pasażowanie. Okazało się, że szczepy II - X były aglutynowane przez surowicę anty-*bovis* i anty-*melitensis* w takim samym mianie (1 : 400). Jedynie szczep I surowica anty-*bovis* zlepiała w mianie 1 : 400, zaś surowica anty-*melitensis* w mianie 1 : 50. Na tej podstawie szczepy II - X uznano za odmiany pośrednie między *bovis* i *melitensis*.

Zawiesiny bakterii szczepów I - X ogrzewane do 100° przez 60 minut zlepiane były przez obie standardowe surowice w mianie 1 : 400 *.

Widzimy więc, że niektóre cechy (biochemiczne i antygenowe) szczepów I - X uległy pewnym przeobrażeniom.

WNIOSKI

1. Metodą metabolicznej krzyżowej hodowli udało się wywołać przeobrażenie niektórych biochemicznych i serologicznych właściwości odmiany *melitensis*, *bovis* i *suis* pałeczek *Brucella*.

2. Tą drogą otrzymano odmiany atypowe i pośrednie zbliżone swymi właściwościami to do jednej, to do drugiej odmiany wzorcowej.

3. W badaniach biochemicznych uzyskanych tą drogą szczepów zauważa się górowanie cech odmian *suis*. W badaniach serologicznych,

* Niektóre szczepy gotowane wypadały również w probówce kontrolnej (domieszka fazy *R*).

polegających na analizie receptorów przy użyciu surowic swoistych, stwierdza się właściwości szczepów pośrednich, serologiczne dwuchwytnych.

4. Można przypuszczać, że zjawiska spostrzegane w opisanych doświadczeniach zachodzą również w przyrodzie w sposób naturalny. Są one prawdopodobnie, w układach biocenotycznych środowiska rozwoju i wzrostu różnych odmian pałeczek *Brucella* powodem zmienności odmianotwórczej.

Fakty te wskazują na to, że odmiany pałeczek *Brucella* (niesłusznie zwane przez niektórych autorów „typami") nie są czymś stałym, statycznym, lecz ulegają różnokierunkowym zmianom, o dużej właściwej dla pałeczek *Brucella* dynamice. Wynikają stąd wnioski praktyczne.

Ю. Парнас

ПОПЫТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРЕОБРАЖЕНИЯ СВОЙСТВ ПАЛОЧЕК *BRUCELLA*

Резюме

1. Методом метаболической гибридизации удалось привести к преображению некоторых биохимических и серологических свойств вариантов *melitensis*, *bovis* и *suis* палочек *Brucella*.

2. Этим путем получены нетипичные варианты сходные по свойствам с тем или вторым стандартным вариантом.

3. В биохимических исследованиях штаммов, полученных этим путем, отмечается превалирование свойств варианта *suis*. В серологических исследованиях, которые заключались в анализе антигенных рецепторов с применением моновалентных сывороток, найдены штаммы с посредственными свойствами.

4. Предполагается, что замеченные в описанных опытах явления имеют место также в природе. Они являются, вероятно, причиной вариантообразующей изменчивости.

5. Описанные факты указывают на то, что варианты палочек *Brucella* (некоторыми авторами именуемые неправильно „типами") не являются чем-то неизменным, статическим. Они подвергаются изменениям в разных направлениях с динамикой свойственной для палочек *Brucella*.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 51 - 52

H. Meisel i *P. Trembowler*

ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNYCH, SEROLOGICZNYCH I TOKSYNOTWÓRCZYCH SZCZEPÓW *CLOSTRIDIUM SORDELLII* Z UWZGLĘDNIENIEM ZMIENNOŚCI

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Oryginalny szczep *Cl. sordellii,* wyodrębniony przez Sordellego przed z górą 20 laty, otrzymano z 2 zakładów. Szczep otrzymany z Instytutu Pasteura w Paryżu rośnie tworząc kolonie gładkie, wypukłe, typowe (Nr PZH 567), otrzymany z Instytutu Taraszewicza rośnie w postaci kolonii płaskich (Nr PZH 536).

Zainteresowało nas pytanie, czy objawom zmienności w morfologii kolonii nie towarzyszą zmiany we właściwościach biochemicznych, antygenowych i toksynotwórczych.

Dla celów kontrolnych doświadczenia wykonano równocześnie z przechowywanym szczepem *Cl. sordellii* pochodzącym z Instytutu Pasteura, który był przedmiotem poprzednich naszych badań (Nr PZH 271).

Właściwości hodowlowe. Wszystkie szczepy badane rosły na podłożach tworząc śluz. Szczep tworzący płaskie kolonie, rosnąc w podłożach z glikozą wykazywał wyraźną tendencję do autoaglutynacji.

Właściwości biochemiczne. Badano zdolności fermentowania glikozy, maltozy, sacharozy, laktozy, mannitolu. Następnie obserwowano właściwości proteolityczne. Wszystkie szczepy zachowywały się identycznie. Wszystkie szczepy wytwarzały indol i ureazę.

Właściwości antygenowe. Uodparniano króliki zawiesiną 18^h hodowli zabitej działaniem 1% formaldehydu, odwirowanej i przepłukanej 2 - 3-krotnie. Zawiesiny wstrzykiwano królikom dożylnie. Uodparnianie trwało na ogół długo. Króliki przeciętnie otrzymywały 10 - 15 dawek w odstępach 5-dniowych. Niektóre króliki uodparniano w ten sposób, że zawiesiny wstrzykiwano przez kolejne 3 dni, a między poszczególnymi takimi seriami dawano zwierzętom 5-dniowy okres wypoczynku.

Odczyny aglutynacyjne. Odczyny wykonywano w probówkach makroskopowo. Probówki wstawiano do cieplarki (37°) na okres 4 godzin. Po odczytaniu wyniku pozostawiono stelaże w temperaturze pokojowej na okres 18^h i odczytywano po raz wtóry.

Wynik odczynów aglutynacyjnych. Surowice ze szczepów tworzących gładkie wypukłe kolonie aglutynowały szczepy z gładkimi koloniami, surowice ze szczepu tworzącego płaskie kolonie aglutynowały wszystkie 3 szczepy.

Właściwości toksynotwórcze. Badano zdolności wytwarzania lecytynazy i swoistej toksyny *sordellii*, letalnej, nie hemolizującej. U wszystkich szczepów poziom wytwarzanej lecytynazy jest stosunkowo niski. Wytwarzaniu lecytynazy sprzyja dodatek glikozy do podłoża. W podłożach bez glikozy ilość wytwarzanej lecytynazy jest mniejsza aniżeli w podłożach z glikozą. Lecytynaza wytwarzana przez szczepy tworzące gładkie i płaskie kolonie jest antygenowo pokrewna toksynie *a perfringens*. Wszystkie 3 szczepy wytwarzają toksynę letalną. Stwierdzono to zarówno odczynami podskórnymi jak i odczynami śródskórnymi, na myszkach i na świnkach morskich.

Odczyn podskórny na myszkach. Myszki ginęły po podskórnym wprowadzeniu 0,5 ml odwirowanego płynu hodowli szczepu *271* rozcieńczonego w dawkach 1/500 - 1/2000, odwirowanego płynu hodowli szczepu *567* rozcieńczonego 1/1000 - 1/1500. Natomiast płyn hodowli szczepu *536* zabijał je dopiero w dawce 1/100.

Podskórne odczyny na świnkach morskich. Płyn hodowli szczepu *271* powodował powstanie martwicy jeszcze w rozcieńczeniu 1/1600 - 1/3200. Płyn hodowli szczepu *567* dawał podobne odczyny, natomiast u świnek, którym wprowadzono płyn hodowli szczepu *536*, martwicę spostrzegano po wprowadzeniu rozcieńczeń około 1/400.

Objawów martwicy nie spostrzegano, gdy wraz z przesączem wprowadzono wzorcową surowicę antytoksyczną *sordellii*, otrzymaną z ośrodka wzorców w Kopenhadze.

Porównawcze badania wykazały, iż dawka *Lr* toksyny odpowiada przeciętnie rozcieńczeniu toksyny 1/320 u szczepu *271*, u szczepu *567* — 1/400, a u szczepu *536* zaledwie 1/40.

Wnioski. Z 2 szczepów pochodnych oryginalnej laseczki wyodrębnionej przez Sordellego jeden rósł tworząc kolonie płaskie, drugi kolonie wypukłe. Szczep tworzący płaskie kolonie wykazywał tendencję do autoaglutynacji. Szczepy nie różniły się właściwościami biochemicznymi. Różnice stwierdzono we właściwościach antygenowych i toksynotwórczych. Surowice ze szczepów gładkich nie aglutynowały szczepu tworzącego kolonie płaskie. Surowice ze szczepu tworzącego kolonie płaskie aglutynowały szczepy o koloniach gładkich i płaskich. Wszystkie 3 szczepy wytwarzały lecytynazę. Szczep tworzący kolonie płaskie wytwarza mniej toksyny letalnej aniżeli szczepy gładkie. Pod względem antygenowym toksyna ze szczepu płaskiego była identyczna z toksyną ze szczepów gładkich.

Wszystkie szczepy były wrażliwe na działanie penicyliny (0,125 - 0,5 j./ml).

Г. Мейзель, П. Трембовлер

БИОХИМИЧЕСКИЕ, СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ И ТОКСИНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА *CLOSTRIDIUM SORDELLII* И ИХ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Резюме

Два штамма бацилла выделенного Сорделли отличались ростовыми свойствами. Один штамм образовал плоские, второй — выпуклые колонии. Эти штаммы отличались также антигенными свойствами и количеством образуемого токсина. С биохимической точки зрения оказались идентичными.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 53 - 56

J. Meduski, I. Małachowska i *A. Linde*

BADANIA NAD WPŁYWEM WARUNKÓW HODOWLI NA PRZEBIEG CZYNNOŚCI ENZYMATYCZNYCH U *ESCHERICHIA COLI*

Z Pracowni Przemiany Pośredniej Zakładu Biochemii i PZH w Warszawie

Celem prac, których kolejne wyniki dziś przedstawimy jest zbadanie w jakich warunkach dochodzi do powstania nowej czynności enzymatycznej u *Escherichia coli*: zużywania cytrynianu jako jedynego źródła węgla.

Badamy to zjawisko w dwóch aspektach:
a) układu tworzącego nową czynność enzymatyczną,
b) układu, z którego nowa czynność enzymatyczna jest tworzona.

Sądzono, że pewną wartość taksonomiczną posiada fakt, iż *Aerobacter aerogenes* rośnie łatwo na podłożu, w którym jako jedyne źródło węgla występuje kwas cytrynowy, natomiast *Escherichia coli* na takim podłożu nie rośnie (Koser 1923). Już jednak Łomiński, Conway, Harper i Basil w 1947 roku wykazali, że w określonych warunkach *E. coli* może rosnąć na podłożu Kosera, a Vaughn, Osborne Wedding, Tabachnick, Beisel i Braxton (1950) podjąwszy to zagadnienie stwierdzili, że dodatek glikozy, fruktozy lub peptonu do pożywki Kosera umożliwia zużycie cytrynianu i wzrost *E. coli*. Szulmajster, Grunberg-Manage i Delavier (1952) stwierdzili następnie, że wzrost *E. coli*, w warunkach umożliwiających metabolizowanie cytrynianu, prowadzi do uzyskania przez ten drobnoustrój właściwości późniejszego zużywania cytrynianu na czystym podłożu Kosera — już bez innych źródeł węgla.

W tym samym czasie Lara i Stokes (1952) wyrazili przypuszczenie, że omawiane przez nas zjawisko polega na braku przepuszczalności błon żywych komórek *E. coli* dla kwasu cytrynowego. Sądzili oni, że pepton, glikoza lub inny węglowodan są niezbędne przy zużywaniu cytrynianu przez *E. coli*, ponieważ zmieniają przepuszczalność błony i dostarczają energii potrzebnej dla przesunięcia kwasu cytrynowego przez błonę komórkową drobnoustroju.

Przypuszczenie to należy jednak odrzucić w świetle wyników Szulmajstra, potwierdzonych przez nas (rozkład kwasu cytrynowego przez *E. coli* na czystym podłożu Kosera), oraz wyników naszych i Sayamy i Fukumi (1954). Wykazaliśmy, że zużywanie kwasu cytrynowego na podłożu zawierającym glikozę zaczyna się równocześnie z zużywaniem glikozy, a nie następuje po tym. Oba procesy przebiegają równolegle do wzrostu zmętnienia hodowli. Jak stwierdziliśmy, można je zauważyć już w pierwszej godzinie wzrostu hodowli. Według badaczy japońskich proces ten miałby się zaczynać dopiero od dziewiątej godziny wzrostu.

Nabywanie zdolności do wykorzystania cytrynianu jest, według naszej opinii, zjawiskiem adaptacji enzymatycznej, gdyż dotyczy całej populacji i ma charakter przemijający. Przystosowanie to utrzymuje się przez kilkanaście pasaży, po czym zanika.

Wychodząc z tych przesłanek wykonaliśmy w drugiej połowie 1953 roku badania nad warunkami powstawania białek o nowej czynności enzymatycznej (Małachowska, Linde i Meduski 1954).

Wiemy, że dla tworzenia białek przez *E. coli* wystarczy jako jedyne źródło azotu amoniak. Natomiast dla utworzenia koenzymów I i II tylko pewnym szczepom wystarcza amoniak, inne muszą rozporządzać niektórymi aminokwasami (Knight 1950).

Interesowało nas: 1) czy dana czynność enzymatyczna pojawi się w obecności NH_3 jako jedynego źródła azotu i 2) czy istnieje progowe stężenie azotu amonowego w podłożu, poniżej którego adaptacja do cytrynianu nie zachodzi. Wykazaliśmy uprzednio (Małachowska, Linde i Meduski), że nowa czynność enzymatyczna (zużywanie cytrynianu) wzrasta niemal linearnie w zakresie od 6 do 100 mg N amoniaku na 1 litr podłoża. Przy większym stężeniu NH_3 wzrost słabnie, osiągając stały poziom już przy 300 - 500 mg N amonowego na 1 litr podłoża.

Drobnoustroje hodowane w tych warunkach zawierają różne ilości N białkowego na 100 g suchej masy bakterii (od 4,75% do 10,3%).

Z kolei pragnęliśmy przekonać się, jaki wpływ na pojawianie się nowej czynności enzymatycznej mieć będzie inne źródło azotu niż grupa amonowa. Po próbach wstępnych dodawano do podłoża jako jedynego źródła N alloksanu (pochodna pirymidyny), teofiliny (puryny) lub pyramidonu (jako pochodnej pyrazolonowej). Jako kontrola służyły podłoża z N amonowym. We wszystkich przypadkach dawano 500 mg N na 1 litr podłoża. Okazało się, że we wszystkich przypadkach zachodzi adaptacja do zużywania cytrynianu, mimo że *E. coli* słabiej użytkuje N teofiliny i pyramidonu, natomiast obficie rośnie na podłożach z siarczanem amonu lub z alloksanem.

Wspominaliśmy już, że dodatek glikozy, fruktozy, lub peptonu jest bodźcem środowiskowym, pod wpływem którego pojawia się nowa czynność enzymatyczna — zużywanie kwasu cytrynowego przez *E. coli*. Pragnąc zbadać swoistość tych bodźców przyjęliśmy jako hipotezę roboczą, że owymi bodźcami mogą być metabolity związane z cyklem kwasów trójkarboksylowych. Glikozę jako substancję bodźcową zastępowaliśmy kolejno: kwasem bursztynowym, kwasem jabłkowym, kwasem fumarowym, kwasem pyrogronowym i kwasem acetooctowym. Wprawdzie ten ostatni związek nie jest bezpośrednio związany z cyklem kwasów trójkarboksylowych, wiąże się z nim jednak pośrednio, choćby przez wspólny metabolit pośredni — rodnik acetylowy.

Okazało się, że wzrost *E. coli* na podłożach z wszystkimi użytymi kwasami był obfity, z wyjątkiem kwasu acetooctowego. Przy wzroście na podłożu z kwasem bursztynowym we wszystkich badanych przypadkach powstawały populacje metabolizujące cytrynian. Hodowle na pozostałych metabolitach nie dawały wyników jednolitych. Możliwe, że w niektórych przypadkach adaptatywna czynność enzymatyczna nie pojawiła się, lub też była hamowana. Wyniki te oraz brak wzrostu na acetooctanie, którego metabolizm jest ściśle związany z funkcjonowaniem koenzymu A, wskazywałyby:

1) na upośledzenie tworzenia koenzymu A (pamiętajmy, że jedynym źródłem N był w tych doświadczeniach siarczan amonu),

2) że w adaptacji do cytrynianu u *E. coli* koenzym A albo nie gra żadnej roli, albo gra rolę podrzędną, ponieważ inne metabolity ową adaptację dawały. Prawdopodobnie więc mechanizm adaptatywnego rozkładu cytrynianu nie jest identyczny z odwrotnością przebiegów procesów syntezy tego związku w cyklu kwasów trójkarboksylowych.

Według Spiegelmana i Halvorsona (1953) do utworzenia czynnego enzymu z prekursora dojść może tylko wtedy, gdy drobnoustrój rozporządza wystarczającą ilością wolnych aminokwasów.

Niejednolitość wyników otrzymanych przez nas w badaniach z metabolitami cyklu kwasów trójkarboksylowych mogła zatem być spowodowana przez to, że:

1) nie same stosowane związki, a ich pochodne są właściwymi bodźcami,

2) postulowany przez Spiegelmana i Halvorsona zapas wolnych aminokwasów w niejednakowym stopniu jest uzupełniany w obecności N amonowego i używanych metabolitów jako jedynych źródeł węgla.

Jeżeli nasze przypuszczenia miałyby okazać się słuszne, to użycie jako bodźców jednofosfoheksozy lub dwufosfoheksozy powinno dać taki sam efekt co użycie glikozy lub stosowanych uprzednio pośrednich metabolitów cyklu Krebsa. Ponadto powinno to doprowadzić do gromadzenia większej ilości wolnych aminokwasów (użycie źródła węgla o większym ciężarze cząsteczkowym).

Wzrost na jednofosfoheksozie był lepszy; następowała też wyraźna adaptacja do cytrynianu. W obecności dwufosfoheksozy jako jedynego źródła węgla wzrost był dużo gorszy, a adaptacja minimalna.

Różnice te moglibyśmy tłumaczyć nierównomiernym tworzeniem aldolazy, glukonokinazy i 2-ketoglukonokinazy przez *E. coli* w omawianych warunkach.

Ponadto jednak zaobserwowaliśmy inne zjawisko. Przy posiewie na podłoże Endo zarówno hodowli na jednofosfoheksozie jak i na dwufosfoheksozie otrzymano dwa rodzaje kolonii: czerwone z metalicznym połyskiem i niezabarwione. Kolonie czerwone rozkładały sacharozę; bakterie z kolonii bezbarwnych zakwaszały węglowodany, nie tworząc gazu i zakwaszając laktozę z opóźnieniem.

Daves i Dagley (1955) potwierdzili i uzupełnili nasze wyniki. Według nich enzym adaptatywny czynny przy zużywaniu cytrynianu przez *E. coli* nie jest związany z cyklem kwasów trójkarboksylowych i nie wymaga obecności koenzymu A. W miarę zużycia cytrynianu enzym ten jest coraz bardziej inaktywowany. Nadmiar cytrynianu unieczynnia go również. Fakty te mogłyby tłumaczyć brak jednolitych wyników.

LITERATURA

1. Daves E. A., Dagley S., 1955: Materiały III Kongr. Biochemików w Brukseli: 28.
2. Knight J., 1950: *The Harvey Lectures*, **43**:71.
3. Koser S. A., 1923: *J. Bact.*, **8**:493.
4. Lara F. J. S., Stokes J. L., 1952: *J. Bact.*, **63**:415.

5. Łomiński I., Conway N. S., Harper E. M. a. Basil J. R., 1947: *Nature,* 160:273.
6. Małachowska I., Linde A., Meduski J., 1954: *Acta Biochim. Polon.,* **1**:133.
7. Sayama E., Fukumi H., 1954: *Jap. Med. Sci Biol.,* **7**:275.
8. Spiegelman S., Halvorson H. O., 1953: *Symp. Soc. Gen. Microbiol.,* 3:98.
9. Szulmajster J., Grunberg-Manago M. a. Delavier C., 1952: *Experientia,* **8**:26.
10. Vaughn R. H., Osborne J. T., Wedding H. T., Tabachnick J., Beisel C. G., i Braxton T., 1950: *J. Bact.,* **60**:119.

J. Meduski, I. Małachowska and *A. Linde*

STUDIES ON THE INFLUENCE OF GROWTH CONDITIONS UPON ENZYMATIC ACTIVITIES OF *ESCHERICHIA COLI*

Summary

In this paper the influence of different growth conditions on the adaptation of the strain *E. coli 0111B4H* to the use of citrate as the only source of carbon has been studied.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 57 - 64

M. Piechowska

ISOLATION OF THE ENZYME RESPONSIBLE FOR KERATOLYSIS

From the Institute of Plant Physiology of the Warsaw University

Keratin appears as a corneous tissue in the form of hoofs, horns, nails, feathers, wool, in the envelopes of the eggs of birds under the name of ovokeratin (Abderhalden and Ebstein 1905 c), and as neurokeratin in the neurolemma (Argiris 1890, Block 1932, 1934, 1939, 1951, Kühne and Chittenden 1890, Nelson 1906, Block and Vickery 1931, Block and Bolling 1939).

The forms α and β are distinguished by the structure of their peptidic fibre (Astbury 1933, 1935, 1949, Astbury and Marwick 1932, Astbury and Bell 1941, Astbury and Woods 1930). It is a common feature of all the keratins that they are insoluble in water, weakly acid or alkaline solutions, organic solvents, and that they are enzymatically resistant to the action of pepsin and trypsin present in the alimentary tract of the carnivora: birds or mammals (Mangold and Dubiski 1930). Only the enzymes contained in the alimentary tract of the larvae of clothes-moths (*Tinola Biselliella*) incorporate some keratinase that is capable to hydrolise this protein (Linderström-Lang and Duspiva 1935, Duspiva 1934, 1936 a, b). But it is not known whether this enzyme is produced by the moths or by some parasitic or symbiotic bacteria of the insect.

Hot, chemical hydrolisis of keratin with concentrated acids or bases has been known and practiced since long (Lindvall, 1881, Abderhalden 1905 a, b, d, 1907, Fischer and Dörpinghaus 1902, Heiduschka 1922 a, b, 1923 a, b). The results of this hydrolysis served for determining the aminoacid composition of various keratins (Abderhalden and Le Count 1905 b, Sammartino 1922, Schenk 1932, Abderhalden and Strauss 1905 d, Abderhalden and Voitinovici 1907, Fischer 1902, Ssadikow 1924, Unna and Golodetz 1907, 1908 a, b).

Unlike other proteins, the keratins contain particularly large amounts of sulphur in the form of cystine (Buchtala 1907, 1910, Friedmann 1903, Mohr 1894, Mörner 1899 Rimington 1929). The majority of keratins show a predominance of alkaline aminoacids: histidine, lysine and arginine, contained in 1:4:12 proportions (Block 1932, 1934, 1939, Block and Vickery 1931, Block and Bolling 1939). This fact prompted Block to divide the keratins into two groups. He reckons hair, hoofs, horns, feathers and wool among eukeratins, and the envelopes of eggs and the neurolemma among pseudokeratins.

Judging by the marked resistance to the action of physical and chemical factors, large amounts of keratin should accumulate in the soil and in natural waters. Since literature contains only scanty information relating to this subject I investigated the decomposition of keratin in the soil.

In previous researches, reported on in earlier papers (Piechowska 1950), there were isolated 6 strains of the genus *Bacillus*, and 3 strains of the genus *Streptomyces* that decomposed in varying degrees the keratin of feathers, hoofs of swine, and envelopes of hen eggs. A factor capable of keratolysis was isolated from these microorganisms.

METHODS AND RESULTS

The strains isolated previously were divided into several series and used in the experiments reported on in this paper. Two tests were run parallel with each of the series. Sterile keratin from the hoofs of swine served in the form of a white powder (1 g per flask) as the only source of carbon and nitrogen. The content of each flask was inoculated with 4.0 ml. of a slightly opalescent aqueous suspension of the microorganisms (1 g. of keratin imbibes 3.5 ml. of water). The keratin was subjected in aerobic conditions to the biological process at a temperature of 30-40°C and initial *pH* 7.0. Decomposition set in after 2 - 3 days. The keratin became covered with a pellicle. Water and, subsequently, slime evolved. Ammonia, hydrogen sulphide and other pungent, smelling gaseous products usually accompanying decay evolved at the beginning in large quantities. With the progress of hydrolysis the tough structure of the hoofs became brittle and loose. Microscopical observations revealed progressive disintegration of the initially fairly thick fibres into ever smaller ones. Each of these consisted of a meshwork of still smaller fibres crossing one another at various angles (resistance of the fibres to physical and chemical factors). (Phot. 1, Table IV — after the p. 64).

The fibrous structure of goose feathers, obtained with the aid of the same strains of bacilli and streptomycetes, is presented for comparison (Phot. 2. Table IV).

With further progress of hydrolysis the keratin turned dark brown. Its consistency changed slowly from solid to that of a thick mud, then, getting gradually thinner, it passed through a semiliquid stage and, finally, the substance took on the form of a thick brown solution. Hydrolysis lasted 2 - 12 months, depending on the culture used. The results of hydrolysis are recorded in table 1.

The percentage of keratin decomposed by different strains and contained in the hydrolysate varied from 52 - 98. Such a high degree of decomposition was observed in both pure and mixed cultures of various strains of bacilli and streptomycetes despite differences in the duration of enzymatical hydrolysis which lasted from 2 to 12 months. *pH* of the hydrolysate varied, dependig on the culture used. from 6,5 to 7,5 which may be taken to indicate that a very weakly alkaline environment is most favourable for the protease produced by the microorganisms.

This assumption was confirmed after the enzyme was isolated, since it showed maximum activity also at a *pH* of 7.0 - 7.5.

RESIDUE OF UNDECOMPOSED KERATIN

Hydrolysis was in none of the experiments complete. The remaining unaffected part of the substance amounted to 2 - 48 per cent of the original quantity, and the average was about 25 per cent. This residue had the form of an amorphous, thick, brown, offensively smelling mud and was in appearance in no way reminiscent of the hard structure of keratin, but was also insoluble in water and weakly alkaline or acid solutions. After the soluble products of hydrolysis were filtered off, the percentage of the nitrogen contained in the remainig undecomposed substance was determined by the Kjeldahl method. Only the residue from controls contained 16.3 per cent of nitrogen. In all other cultures

the nitrogen content was less, which may be taken to indicate that the residue was no more identic with keratin.

The smallest decrease of total N was established in samples hydrolysed by various strains of bacilli C_1, D_1, D, F. The decrement was largest with the strain of *Bacillus* A, (33.7 - 35.0 per cent) and in streptomycetes cultures (37.6 per cent). In the remaining cultures the decrement varied within 11.2 - 29.5 per cent.

ISOLATION OF THE KERATOLYTIC ENZYME

Not only the appearance but, above all, the amount of keratin used in the experiments demonstrated that it was actually hydrolysed. Consequently, isolation of the agent responsible for this hydrolysis was undertaken.

The isolated enzyme represents a mixture of proteases and peptidases, since its action is characteristic of both types. In each sample of the decomposed keratin, among products of its hydrolysis and bacterial autolysis, there was contained an active enzyme produced by live cells. For purposes of isolation, a sterile filtrate was prepared from the particular cultures, which should have contain the active exoenzyme. The procedure was as follows: 50 ml. of distilled water, warmed to 40 °C., were added to each sample (1 g. of keratin) resembling in consistency a thick mud. The mixture was stirred and then centrifuged in order to separate the residue of undecomposed keratin; subsequently, the resulting supernatant was passed through a Schott filter. The assumption was that the sterile filtrate should contain the exoenzyme responsible for hydrolysis of not only keratin but also other proteins. The activity of the filtrate was tested at a temperature of 35 - 40 °C., in sterile conditions, on 12 per cent gelatine and 2 per cent hen egg albumin. 1 ml. of the sterile filtrate hydrolysed completely within 48 hours 600 mg. of the dry substance of gelatine; 50 per cent of hen egg white was hydrolysed in the same space of time.

After the presence of the active enzyme in the filtrate was established, it was isolated in solid form. The small amount of the examined filtrate and quick inactivation greatly obstructed salting out with ammonium sulphate. Ethyl alcohol, whose final concentration in the solution amounted to 70 per cent, proved most effective. When the isoelectric point (*pH* 4.0 - 4.5) was reached and 5 - 10 volumes of ethyl alcohol were added, the clear filtrate became turbid and opalescent and, subsequently, a jelly-like sediment settled out. The sediment was centrifuged or filtrated and then hydrolysed. Hydrolysis was always successful. Great difficulties were met with in desiccating the jelly-like sediment since it was readily inactivated. It remained fully active only when desiccated *via* the lyophile process. Stored in dry state at a temperature of 0 °C it preserved its lytic properties over a period of 4.5 years. It is active at temperatures of 38 - 45 °C and hydrolyses 12 per cent gelatine, coagulated hen egg white and powdered keratin. 2 ml. portions of 12 per cent gelatine were added to vials each containing 1.5 ml. of a mixture of freeze-dried enzymes, whose dry mass varied from 0.78 to 1.725 mg., dependig on the

strains responsible for their production. Hydrolysis took place at a temperature of 38°C within 24 - 36 hours. *pH* of the hydrolysate was 6.0 - 7.5

Table I

Hydrolysis of keratin (hoofs of swine) by various microorganisms
Hydroliza keratyny (racice świni) przez różne drobnoustroje

Strains Szczep	Amount of keratin Ilość keratyny	Duration of hydrolysis: months Czas hydrolizy (miesiące)	Per cent of keratin % keratyny		*pH* of the hydrolysate *pH* hydrolizatu
			decomposed rozłożonej	not decomposed nie rozłożonej	
Flowerpot earth — natural hydrolysis	1.0	2	76	24	8.0
Gleba doniczkowa	1.0	10	78	22	7.0
All strains of the streptomycetes	1.0	7	86	14	6.5
Wszystkie szczepy streptomyces	1.0	12	88	12	6.0
Bacilli and streptomycetes together	1.0	11	83	17	6.5
Laseczki i promieniowce łącznie	1.0	12	85	15	6.0
All strains of the bacilli	1.0	9	64	36	6.5
Wszystkie szczepy laseczek	1.0	11	62	38	6.5
Inne laseczki:	1.0	10	73	27	7.5
Other bacilli: A_1, A_2, A_3, C_1, C_2	1.0	10	75	25	7.5
*Bacillus** A_1	1.0	9	69	31	7.0
„ A_2	1.0	8	52	48	7.0
„ A_3	1.0	7	85	15	7.5
	1.0	8	89	11	7.6
„ C_1	1.0	9	66	34	7.5
„ C_2	1.0	9	85	15	7.5
„ B	1.0	12	88	12	7.5
Fast growing bacilli: D_1 D_2	1.0	6	53	47	7.5
Szybko rosnące laseczki:	1.0	7	58	42	7.5
*Bacillus** D_1	1.0	10	67	33	7.0
„ D_2	1.0	10	81	19	7.5
„ E	1.0	8	62	38	6.5
„ F	1.0	8	65	35	7.0
„ A_3	32.0	12	94	6	7.5
	32.0	12	98	2	7.5
Control — sterile	1.0	10	0	100	7.1
Kontrola — jałowa	1.0	10	0	100	7.1

* several varieties of one strain.
liczne odmiany jednego szczepu.

Table II

Percentage of total nitrogen in the residue not dissolved in water

Procentowa zawartość azotu w pozostałości nierozpuszczalnej w wodzie

Strains Szczepy	Total N per cent N całkowity %	Total N expressed in per cent of total N from controls N całkowity wyrażony jako % N w kontroli	Total N decrement per cent Procentowy spadek zawartości N całkowitego
Flowerpot earth — natural hydrolysis	11.60	71.2	28.8
Gleba doniczkowa	11.80	72.4	27.6
All strains of the Streptomycetes	10.19	62.4	37.3
Wszystkie szczepy promieniowców	11.66	71.5	28.5
Bacilli and Streptomycetes together	13.82	84.8	15.2
Laseczki i promieniowce łącznie	14.04	86.0	14.0
All strains of Bacilli	12.36	77.5	22.5
Wszystkie szczepy laseczek	12.41	76.1	23.9
Other bacilli: A_1, A_2, A_3, C_1, C_2.	11.56	70.8	29.2
Inne laseczki:	11.96	73.4	26.6
*Bacillus** A_1	12.04	74.0	26.0
	12.76	78.2	21.8
„ A_2	12.76	78.2	21.8
	12.47	76.3	23.7
„ C_1	15.67	96.0	4.0
	14.92	91.7	8.3
„ C_2	15.07	92.2	7.8
	14.48	88.8	11.2
Fast growing bacilli: D_1 D_2	12.78	78.4	21.6
Szybko rosnące laseczki:	12.85	78.7	21.3
*Bacillus** D_1	15.81	97.0	3.0
	15.22	93.7	6.3
D_2	15.60	95.8	4.2
	15.90	97.5	2.5
F	15.46	94.8	5.2
	15.65	96.0	4.0
A_3*	10.60	65.0	35.0
	10.80	66.3	33.7
Control — sterile	16.30	100.0	0
Kontrola — jałowa	16.30	100.0	0

* Several varations (2-3) of one strain.
liczne odmiany jednego szczepu.

and depended on the strain used. Hydrolysis of coagulated hen egg white and powdered keratin was produced analogically. At a temperature of 38°C the egg white turned brown within 24 hours; after seven days hydrolysis became evident and transformed the egg white into a thick, brown syrup.

The freeze dried enzyme dissolved completely, within a few hours, in gelatine and glycerin at *pH* 7.0 - 7.5; it dit not dissolve at temperatures of 20 - 55°C and *pH* 8.0 - 3.0, or in cold distilled water. 70 per cent ethyl alcohol failed to denaturate it at a temperature of 38°C within 40 hours; when the reagent was removed, the enzyme dissolved completely in 12 per cent gelatine within 20 hours. It was inactivated by temperatures exceeding 45°C. The isoelectric point was at *pH* 4.0 - 4.5. The dry mass of the enzyme was equal to 1.3 per cent of the initial quantity of keratin; 32 g. of this substance yielded upon hydrolysis 420 mg. of dry powder.

CHROMATOGRAPHY OF THE PRODUCT OF HYDROLYSIS OF KERATIN

As was mentioned before, the enzymatic product of hydrolysis of keratin yielded upon chemical treatment several amino-acids, viz., tyrosine, leucine, histidine, arginine. In the present research, paper partition chromatography not only confirmed previously obtained results but raised also the number of aminoacids isolated, consistently yielding, on repetition, identical results. The enzymatic products of hydrolysis were separated with the aid of the ascending and circular techniques.

Whatman's paper Nº 1 was used and the solvent consisted of n-butanol: concentrated acetic acid: water (4 : 1 : 1 by volume). The time of partition was 10 - 12 hours. The hydrolysate was taken from particular cultures for analysis in 5 µl and 10 µl portions. The chromatograms were developed by sprayinig with 0.1 per cent ninhydrin in acetone, and 9 min. drying at 100° C. The spots were outlined in pencil and the chromatograms fixed in parrafin wax. The aminoacids were identified against 1 per cent standards applied in quantities of 3 µl. Qualitative determination methods were used. Quantitative determination tests by chromatographic as well as colorimetric methods are now in progress.

Qualitative chromatography of the keratin hydrolysates (Phot. 3 and 4) revealed the presence of glycine, leucine, serine, valine, alanine, cystine, tyrosine, histidine, lysine, arginine, and glycyl-l-tyrosine.

SUMMARY

In the course of the experiments it was established that:

1) keratin is enzymatically hydrolysed by soil microorganisms, bacteria (*Bacillus*) and streptomycetes, at *pH* 6.0 - 8.0, depending on the strain used (percentage of keratin decomposed varied with the strains from 52 to 98);

2) the freeze-dried factor, responsible for keratolysis, hydrolysed keratin, 12 per cent gelatine and 2 per cent hen egg albumin; it could be stored over a period of 4 ½ years without losing activity;

3) paper partition chromatography revealed the presence of the following aminoacids in the hydrolysate of keratin (hoofs of swine): glycine, leucine, serine, valine, alanine, cystine, tyrosine, histidine, lysine, arginine and glycyl-l-tyrosine.

This research has been carried out at the Institute of Plant Physiology of the University of Warszawa, and I wish to express my heart-felt thanks to Professor Dr K. Bassalik for his help, valuable remarks and friendly discussion of the results.

LITERATURE

1. Abderhalden E., Walls G., 1905 a. *Hoppe Seylers Z.*, **46**:31.
2. Abderhalden E., Le Count E. R., 1905 b, *Hoppe Seylers Z.*, **46**:40.
3. Abderhalden E., Ebstein E., 1905, c, *Hoppe Seylers Z.*, **48**:530.
4. Abderhalden E., Strauss E., 1905 d, *Hoppe Seylers Z.*, **48**:530.
5. Abderhalden E., Voitinovici A., 1907, *Hoppe Seylers Z.*, **52**:348.
6. Argiris A., 1890, *Zs. Biol.*, **26**.
7. Astbury W. T., 1933, *Trans. Faraday Soc.*, **29**:193.
8. Astbury W. T., 1933, Fundamentals of Fibre Structure, Oxford.
9. Astbury W. T., 1949, *Nature*, **164**:441.
10. Astbury W. T., Woods H. J., 1930, *Nature*, **126**:913.
11. Astbury W. T., Marwick T. C., 1932, *Nature*, **130**:309.
12. Astbury W. T., Bell F. O., 1941, *Nature*, **147**:696.
13. Block R. J., 1932, *J. Biol. Chem.*, **94**:647.
14. Block R. J., 1934, *J. Biol. Chem.*, **104**:339.
15. Block R. J., 1939, *J. Biol. Chem.*, **128**:181.
16. Block R. J., 1951, *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**:267.
17. Block R. J., Vickery H. B., 1931, *J. Biol. Chem.*, **93**:113.
18. Block R. J., Bolling D., 1939, *J. Biol. Chem.*, **127**:685.
19. Buchtala H., 1907, *Hoppe-Seylers Z.*, **52**:474.
20. Buchtala H., 1910, *Hoppe-Seylers Z.*, **69**:312.
21. Duspiva F., 1934, *Z. vergl. Physiol.*, **21**:632.
22. Duspiva F., 1936 a, *Hoppe Seylers Z.*, **241**:168.
23. Duspiva F., 1936 b, *Hoppe Seylers Z.*, **241**:177.
24. Fischer E., 1902,*Hoppe Seylers Z.*, **36**:477.
25. Fischer E., Dorpinghaus Th., 1902, *Hoppe Seylers Z.*, **36**:462.
26. Friedmann E., 1903, *Hofm. Beitr.*, **3**:184.
27. Heiduschka A., Komm E., 1922 a, *Hoppe Seylers Z.*, **121**:221.
28. Heiduschka A., Komm E., 1922 b, *Hoppe Seylers Z.*, **124**:37.
29. Heiduschka A., Komm E., 1923 a, *Hoppe Seylers Z.*, **126**:130.
30. Heiduschka A., Komm E., 1923 b, *Hoppe Seylers Z.*, **126**:261.
31. Kühne W., Chittenden R. H., 1890, *Zs. Biol.* **26**.
32. Lindeström-Lang K., Duspiva F., 1935, *Hoppe Seylers Z.*, **237**:131.
33. Lindvall V., 1881, *Malys Jahresberichte.*, **11**:38.
34. Mohr P., 1894, *Hoppe Seylers Z.*, **20**:403.
35. Mörner K. A. H., 1899, *Hoppe Seylers Z.*, **28**:595.
36. Mangold E., Dubiski J., 1930, *Wiss. Arch. Landw.* Abt. *B.*, **4**:201.
37. Nelson B. E., 1906, *J. Amer. Chem. Soc.*, **38**:2558.
38. Piechowska M., 1950, *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **2**:313.
39. Rimington C., 1929, *Biochem. J.*, **23**:41.
40. Ssadikow W. S., 1924, *Biochem. Z.*, **150**:361.

41. Sammartino U., 1922, *Biochem. Z.*, **133**:476.
42. Schenk E. G., 1932, *Hoppe Seylers Z.*, **211**:160.
43. Unna P. G., Golodetz L. 1907, *M—H. prakt.Dermat.*, **44**:1.
44. Unna P. G., Golodetz L., 1908 a, *M. H. prakt. Dermat.*, **47**:62.
45. Unna P. G., Golodetz L., 1908 b, *M.—H. prakt. Dermat.*, **47**:75.

M. Piechowska

WYOSOBNIENIE ENZYMU POWODUJĄCEGO KERATOLIZĘ

Streszczenie

Kontynuując badania nad keratolizą przeprowadzoną przez bakterie (*Bacillus*) i promieniowce (*Streptomyces*) wyizolowano enzym, będący mieszaniną proteinaz i peptydaz przeprowadzający czynności charakterystyczne dla obydwu typów.

Poprzednio uzyskane wyniki co do produktów rozkładu zostały potwierdzone przy pomocy metody chromatografii bibułowej, lecz jednocześnie wykazano, że ilość produktów jest znacznie powiększona.

W hydrolizacie keratyny stwierdzono obecność dość znacznej liczby aminokwasów: glikokolu, alaniny, leucyny, waliny, seryny, cystyny, tyrozyny, glicyl-l-tyrozyny, histydyny, lizyny i argininy. Enzym keratolityczny otrzymany w stanie suchym metodą liofilizacji i przechowywany w temperaturze 0° nie utracił własności litycznych przez długi okres czasu (4 i 1/2 roku). Wykazuje on aktywność w granicach temperatury 38 - 45°, hydrolizując 12-procentową żelatynę, ścięte białko kurze i keratynę w postaci proszku.

Liofilizowany enzym rozpuszcza się całkowicie w 12-procentowej żelatynie i glicerynie przy *pH* 7,0 - 7,5, nie rozpuszcza się przy *pH* 8,0 ani *pH* 3,0 w temperaturze 20 - 55°, oraz w zimnej wodzie destylowanej, 70% etanol nie denaturuje go w ciągu 40 godzin w temperaturze 38°, gdyż po usunięciu alkoholu enzym rozpuszcza się w 12-procentowej żelatynie. Temperatura powyżej 45° powoduje inaktywację. Punkt izoelektryczny leży w *pH* 4,0 - 4,5.

Sucha masa enzymu stanowi 1,3% wyjściowej ilości keratyny (z 32-gramowej hodowli otrzymano 420 mg suchego proszku). Wszystkie próby z enzymem przeprowadzano w warunkach jałowych.

Tablica IV

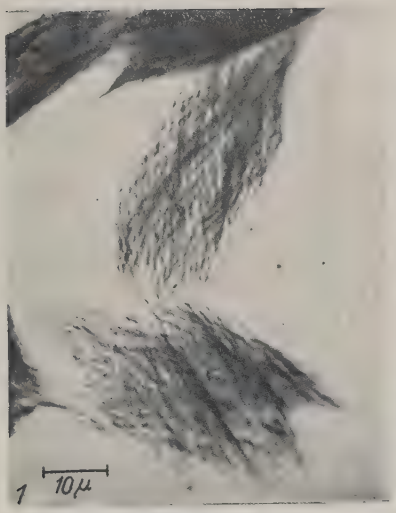
Do pracy: Piechowska, str. 57.

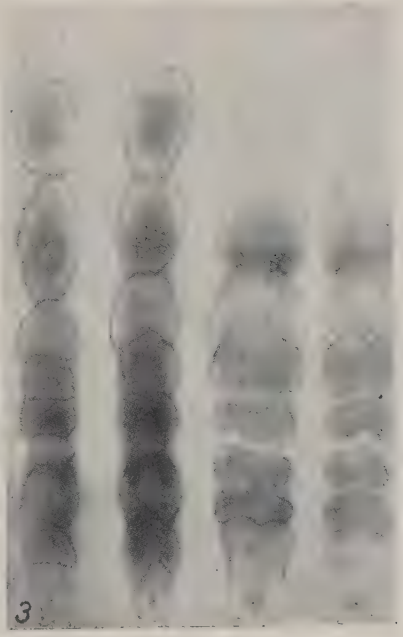
Fot. 1. Włóknista struktura keratyny racic świni.
Fot. 2. Włóknista struktura keratyny pióra gęsiego.
Fot. 3 i 4. Enzymatyczna hydroliza keratyny (z racic świni). — Chromatogramy na bibule. Rozpuszczalnik: układ: *n*-butanol — kwas octowy — woda (4 : 1 : 1). Wywoływacz: 0,1% acetonowy roztwór ninhydryny.

Tabela IV

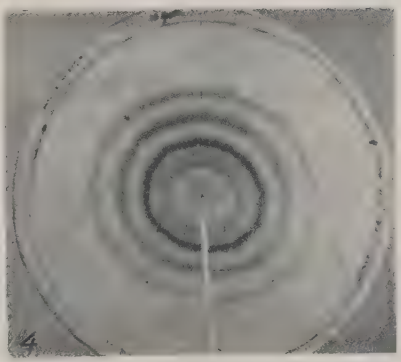
To the paper Piechowska, p. 57.

Phot. 1. The fibrous structure of hoofs of swine.
Phot. 2. The fibrous structure of goose feathers.
Phot. 3 i 4. Enzymatical hydrolysis of keratin (hoofs of swine). Paper chromatogramms. Solvent: *n*-butanol, acetic acid, water (1 : 1 : 1). Developer: 0,1% ninhydrin in acetone.


1
10μ


3

2
10μ


4

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 65 - 68

W. Tysarowski, S. Kwiek i *B. Migdalska*

ZACHOWANIE SIĘ HEMOPROTEIN W OBECNOŚCI PRĄTKÓW KWASOOPORNYCH

II. WPŁYW OKSY- I METHEMOGLOBINY NA ODDYCHANIE *MYC. PHLEI* ORAZ *MYC. TUBERCULOSIS* SZCZEP *C*

Z Zakładu Biochemii i Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

W doniesieniu I (Tysarowski, Kwiek i Migdalska, 1955) stwierdzono, że methemoglobina jest redukowana w czasie wzrostu prątków gruźlicy szczepu H_{37} *Rv*. Nasuwa się zatem przypuszczenie, że dodane do podłoża hemoproteidy wpływają na metabolizm prątków.

W obecnym doniesieniu przedstawione są wyniki uzyskane w doświadczeniach nad wpływem oksy- i methemoglobiny na zużycie tlenu przez prątki zjadliwe i saprofityczne.

METODYKA

1. Prątki gruźlicy szczep C* hodowano na podłożu Sautona przez około 5 tygodni. Kożuch bakteryjny zbierano na sączku szklanym i przemywano trzykrotnie wodą destylowaną; następnie prątki rozbijano w kolbkach z perełkami szklanymi i zawieszano w buforze fosforanowym M/15, *pH* 7,0.

2. Prątki saprofityczne, *Myc. phlei*, hodowano na pożywce Sautona 6 - 7 dni. Zawiesinę przygotowywano jak opisano w punkcie 1.

3. Gęstość zawiesin określano według zawartości azotu całkowitego, oznaczonego metodą Kjeldahla.

4. Oksyhemoglobinę przygotowywano z krwi końskiej lub bydlęcej, hemolizując toluenem trzykrotnie przemyte solą fizjologiczną erytrocyty. Otoczki komórkowe i toluen odwirowywano.

5. Methemoglobinę otrzymywano przez dodawanie do całej krwi 0,14 ml 1% azotynu sodowego. Krwinki methemoglobinowe uzyskiwano po odwirowaniu całej krwi. Roztwór methemoglobiny otrzymano po hemolizie krwinek toluenem i odwirowaniu.

6. Zużycie tlenu badano „bezpośrednią" metodą Warburga. W naczynkach środkowych umieszczano 0,2 ml 10% KOH. Objętość płynu badanego wynosiła 3,0 ml.

7. Zawartość oksy- i methemoglobiny oznaczano zmodyfikowaną metodą Evelyna i Malloya (1938) opisaną w podręczniku Hawk, Oser, Summerson (1949).

WYNIKI

W licznych doświadczeniach wykazano, że oddychanie prątków *Myc. phlei*, endogenne i w obecności takich substratów jak aminokwasy, kwasy tłuszczowe i cukrowce, wzmaga się pod wpływem niskich stężeń hemo-

* Dziękujemy Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek za dostarczenie hodowli prątków.

globiny. Wpływ wyższych stężeń na oddychanie endogenne *Myc. phlei* przedstawia tabela I.

Z danych tabeli wynika, że methemoglobina w erytrocytach w stężeniu 5% pobudza silniej oddychanie *Myc. phlei*, niż stężenie 10 i 20%; wpływ ten jest wyższy niż analogicznych stężeń oksyhemoglobiny (z wyjątkiem stężenia 20%).

Tabela I

Wpływ hemoglobiny na oddychanie endogenne zawiesin *Myc. phlei*
Effect of hemoglobin on the endogenous respiration in suspension of *M. phlei*

Hemoglobina Hemoglobin		Średnie oddychanie na 1 godz. na 1 ml zawiesiny Respiration per 1h per 1 ml bacterial suspension		µl O_2/mg N	
Rodzaj Kind of preparat	Stężenie w % Concentration %	bez Hb without Hb	z Hb with Hb	bez Hb without Hb	z Hb with Hb
1. Roztwór — Solution Oksyhb.+Methb. w obecności bursztynianu M/50	0.2	39	57	98	143
2. Erytrocyty — Erythrocytes					
Oksyhemoglobina	20	78	223	111.0	316
Methemoglobina	20	78	203	111.0	288
Oksyhemoglobina	10	78	163	111.0	231
Methemoglobina	10	78	322	111.0	457
Oksyhemoglobina	5	78	394	111.0	559
Methemoglobina	5	78	577	111.0	819
3. Roztwór — Solution					
Oksyhemoglobina	12		371		163
Methemoglobina	12		369		162
Oksyhemoglobina	10		316		139
Methemoglobina	10		395		173
Oksyhemoglobina	8		305		134
Methemoglobina	8		367		161
Oksyhemoglobina	6		278		122
Methemoglobina	6		324		142

Methemoglobina w roztworze w stężeniu 6 - 12% działa tylko nieznacznie pobudzająco na oddychanie *Myc. phlei*, podobnie zresztą jak i oksyhemoglobina.

Odpowiednie preparaty methemoglobiny i oksyhemoglobiny mają nieco odmienny wpływ na prątki zjadliwe (tabela II). Oksyhemoglobina zawarta w krwi całej, w erytrocytach i w roztworze ma wyraźnie pobudzający wpływ na oddychanie szczepu *C* w obecności glicerolu.

Methemoglobina w roztworze w stężeniu 7,37 - 3.69% silnie hamuje oddychanie prątków gruźlicy szczepu C. Występuje tu przeciwne działanie methemoglobiny niż w wypadku zawiesin *Myc. phlei.*

Tabela II

Wpływ hemoglobiny na oddychanie *Myc. tuberculosis C* w obecności M/50 glicerolu
Effect of hemoglobin on the respiration of *M. tuberculosis*, strain *C* in presence of glicerol

Hemoglobina Hemoglobin		Średnie oddychanie na 1 godz. na 1 ml zawiesiny Respiration per 1h per 1 ml of bacterial suspension		µl O_2/mg N	
Rodzaj Kind of preparat	Stężenie w % Concentration %	bez Hb without Hb	z Hb with Hb	bez Hb without Hb	z Hb with Hb
1. Roztwór — Solution					
Oksyhb.+Methb.	2	227	358		
2. Krew cała — Blood					
Methemoglobina	6	305	402	77	102
Oksyhemoglobina	6	305	504	77	128
3. Osocze — Blood plasma	4	325	393	48	58
4. Erytrocyty — Erythrocytes					
Methemoglobina	7.37	325	309	48	45
Oksyhemoglobina	7.37	325	518	48	76
5. Roztwór — Solution					
Methemoglobina	7.37	314	181	42	24
Methemoglobina	5.51	314	257	42	34
Methemoglobina	3.69	314	275	42	37
Methemoglobina	1.85	314	318	42	43
Oksyhemoglobina	7.37	314	499	42	67

WNIOSKI

1. Stwierdzono znaczny wpływ oksy- i methemoglobiny na oddychanie prątków zjadliwych *Myc. tuberculosis* szczep C i saprofitycznych *Myc. phlei.*

2. Methemoglobina silniej pobudza oddychanie *Myc. phlei* niż oksyhemoglobina. Przeciwny wpływ mają te hemoproteidy na zużycie tlenu przez *Myc. tuberculosis* szczep *C.*

LITERATURA

1. Tysarowski W., Kwiek S. i Migdalska B., 1955: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoodpornych. I. Redukcja methemoglobiny w hodowli prątków gruźlicy, *Gruźlica*, 23:13.
2. Hawk P., Oser B. a. Summerson W., 1949: Practical Physiological Chemistry, The Blakiston Company.

W. Tysarowski, S. Kwiek and *B. Migdalska*

THE BEHAVIOUR OF HEMOPROTEINS IN THE PRESENCE OF ACIDFAST BACILLI

II. INFLUENCE OF OXYHEMOGLOBIN AS WELL AS METHEMOGLOBIN ON THE RESPIRATION OF VIRULENT STRAIN AND SAPROPHYTIC STRAIN, *MYCOBACTERIUM PHLEI*

Summary

In vitro experiments revealed a considerable influence of oxyhemoglobin as well as methemoglobin on the oxygen uptake of tubercle bacilli, both virulent strain „C" and saprophytic strain *Myc. phlei*. Methemoglobin enhances the respiration of the strain *Myc. phlei* more than does oxyhemoglobin. On the contrary respiration of the virulent strain „C" is more influenced by oxyhemoglobin.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 69 - 71

W. Tysarowski i *S. Kwiek*

ZACHOWANIE SIĘ HEMOPROTEIN W OBECNOŚCI PRĄTKÓW KWASOOPORNYCH

III. REDUKCJA METHEMOGLOBINY PRZEZ ZAWIESINY PRĄTKÓW GRUŹLICY

Z Zakładu Biochemii i Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Kontynuując doświadczenia nad zachowaniem się hemoprotein w obecności prątków (Tysarowski, Kwiek, Migdalska 1955, 1956 a), zbadano redukcję methemoglobiny w zawiesinach prątków gruźlicy.

METODYKA

1. Zawiesiny prątków gruźlicy szczep H_{37} *Rv* i *C* przygotowywano z 5-tygodniowych hodowli metodą opisaną w pracy poprzedniej (Tysarowski, Kwiek, Migdalska 1956). Tamże opisano otrzymywanie roztworu methemoglobiny i metodę oznaczania oksy- i methemoglobiny.

2. Doświadczenia z tlenkiem węgla wykonano w aparacie Warburga. CO otrzymano z kwasu mrówkowego działaniem stężonego H_2SO_4. Sporządzanie mieszanek zawierających CO oraz napełnianie naczyniek Warburga przeprowadzono przy pomocy urządzenia opisanego w monografii Umbreita, Burrisa i Stauffera (1951).

WYNIKI

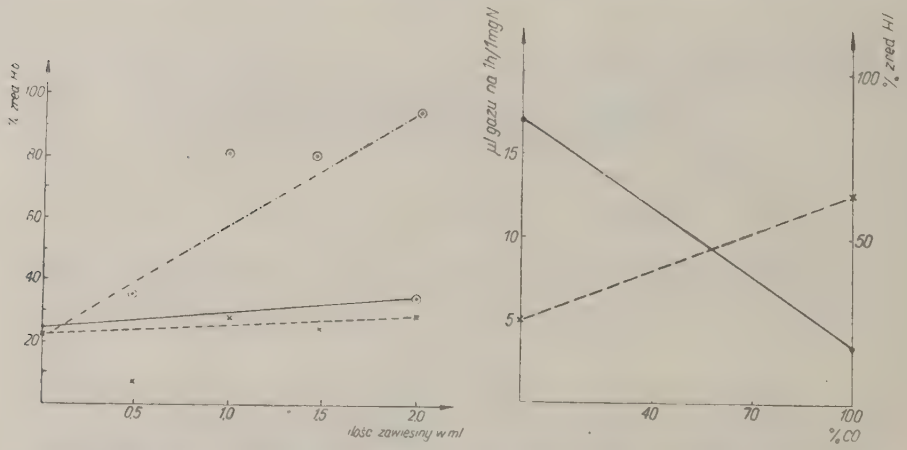
Methemoglobina, dodana do zawiesin prątków ulega redukcji na hemoglobinę. Dane rys. 1 wykazują wzrost ilości hemoglobiny w czasie inkubacji prątków z methemoglobiną.Do probówek dodano odpowiednią ilość zawiesiny żywej lub zinaktywowanej przez 15 minut w 100° (lub sączonej hodowli prątków) szczepu *H 37 Rv* (1,8 mg N w 1 ml), uzupełniając do objętości 10 ml 1.5-procentowym roztworem methemoglobiny w pożywce Youmansa. Roztwory pokryto 2 cm warstwą płynnej parafiny. Inkubowano 12 gdzin w 37°. Doświadczenia wykonano jałowo.

Hodowla prątków, po przesączeniu przez sączek Seitza oraz zawiesina zinaktywowana ogrzewaniem nie wykazują zdolności redukowania methemoglobiny. Doświadczenie to wskazuje, że redukcja nie zależy od związków drobnocząsteczkowych; uwarunkowana jest natomiast metabolizmem żywych komórek prątków.

Przy badaniu wpływu CO na oddychanie do naczyniek Warburga o różnym stężeniu CO dodano: 1 ml zawiesiny szczepu *C* (96 mg N w 1 ml) i 2 ml pożywki Youmansa, zawierającej 2.2% methemoglobiny.

Czas doświadczenia — 4 godziny. Przebieg krzywych na rys. 2 świadczy, że mechanizm redukcji powiązany jest z układami oddechowymi prątków. Oddychanie prątków zmniejsza się bowiem proporcjonalnie do wzrostu stężenia CO w fazie gazowej o stałej zawartości tlenu. Wraz ze spadkiem oddychania wzmaga się szybkość redukcji methemoglobiny.

Przeprowadzone badania wykazują, że methemoglobina jest, obok błękitu metylenowego, tetrazolu, soli telluru i kompleksu żelaza z kwa-



Rys. 1. Redukcja methemoglobiny przez prątki żywe, inaktywowane ciepłem i hodowlę sączoną przez sączek Seitza. ⊙—·—⊙ zawiesina żywa, ×— — — —× zawiesina inaktywowa ciepłem, ⊙———⊙ pożywka sączona przez sączek Seitza.

Rys. 2. Wpływ tlenku węgla na redukcję methemoglobiny i oddychanie w zawiesinach prątków gruźlicy. o———o zużycie gazu ×— — — —× ilość powstałej hemoglobiny.

Fig. 1. Reduction of methemoglobin in suspension of living tubercle bacilli, bacilli inactivated by heat and in culture filtrate. ⊙——⊙— living bacilli ×— — — —×— bacilli inactivated by heat, ⊙———⊙ culture filtrate.

Fig. 2. Effect of carbon monoxide on the reduction of methemoglobin and the respiration of tubercle bacilli. ⊙———⊙ amount of gas adsorbed, ×— — — —× amount of hemoglobin.

sem etylenodwuaminoczterooctowym (Tysarowski 1954), jeszcze jednym akceptorem elektronów w doświadczeniach z prątkami kwasoopornymi *in vitro*.

Budowa methemoglobiny jest, w porównaniu z pozostałymi znanymi akceptorami elektronów, najbardziej zbliżona do fizjologicznych przenośników elektronów w komórkach (cytochromy, oksydaza cytochromowa).

W świetle naszych doświadczeń należy wziąć pod uwagę możliwość wzajemnego oddziaływania *in vivo* pomiędzy układami oddechowymi prątków gruźlicy i hemoproteidami ustroju zakażonego, o czym wspominaliśmy na innym miejscu (Tysarowski, Kwiek 1954).

WNIOSKI

1. Methemoglobina jest redukowana przez zawiesiny prątków gruźlicy.
2. Hamowanie oddychania tlenkiem węgla wzmaga redukcję, co świadczy o powiązaniu mechanizmu redukcji z układami oddechowymi prątków.

LITERATURA

1. Tysarowski W. i Kwiek S., 1954: Oddychanie prątków gruźlicy. *Gruźlica*, 22:213.
2. Tysarowski W., 1954: Wpływ kompleksu żelaza z kwasem etylenodwuaminoczterooctowym na oddychanie *Mycobacterium phlei*. *Acta Physiol. Polon.*, 5:597.
3. Tysarowski W., Kwiek S. i Migdalska B., 1955: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoopornych. I. Redukcja methemoglobiny w hodowli prątków gruźlicy. *Gruźlica*, 23:13.
4. Tysarowski W., Kwiek S. i Migdalska B., 1956: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoopornych. II. Wpływ oksy- i methemoglobiny na oddychanie *Myc. phlei* oraz *Myc. tuberculosis* szczep *C. Acta Microbiol. Polon.*, 5:65.
5. Umbreit W., Burris R. a. Stauffer J., 1951: Manometric techniques and tissue metabolism, Burgers Publishing.

W. Tysarowski and *S. Kwiek*

THE BEHAVIOUR OF HEMOPROTEINS IN THE PRESENCE OF ACIDFAST BACILLI

III. REDUCTION OF METHEMOGLOBIN IN SUSPENSIONS OF TUBERCLE BACILLI

Summary

In vitro experiments showed reduction of methemoglobin in suspensions of tubercle bacilli. When the respiration of tubercle bacilli was inhibited by carbon monoxide, the reduction rate of methemoglobin increased. This suggest that the reduction mechanism depends on respiratory systems of bacilli.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 73 - 76

J. Meduski, A. Zbrożyna, A. Zakrzewska i *D. Olkowska*

BADANIA NAD FOSFOLIPAZĄ *C CL. PERFRINGENS* LECYTYNA WODOROWANA JAKO SUBSTRAT FOSFOLIPAZY *C* W ŚRODOWISKU WODNYM

Z Pracowni Przemiany Pośredniej Zakładu Biochemii PZH w Warszawie

W pracy niniejszej * wykazano, przy użyciu adaptowanej metody manometrycznej i własnej metody chemicznej oznaczania czynności fosfolipazy *C*, że lecytyna wodorowana jest substratem fosfolipazy *C* w środowisku wodnym.

PREPARAT FOSFOLIPAZY *C*

W badaniach naszych użyliśmy otrzymany przez nas suchy preparat toksyny *α*. Sposób otrzymania opierał się na pracach van Heyningen i Bidwell (1948). Materiałem wyjściowym były przesącze 24-godzinnej hodowli *Clostridium perfringens* typu *A*, szczep *BP6K*, na bulionie z wyciągu serca bydlęcego z dodatkiem 1% peptonu i 0,5% chlorku sodu oraz 0,5% glikozy. Dokładny sposób preparatyki i właściwości otrzymywanej fosfolipazy *C* podane zostaną gdzie indziej.

SUBSTRAT FOSFOLIPAZY *C*

W badaniach nad fosfolipazą *C* mikrobiolodzy na ogół nie używają jako substratów czystych preparatów lecytyny. Jako substratu używa się jałowej emulsji żółtka jaja kurzego z 0,9% NaCl. Pewną modyfikacją jest użycie roztworu owolecytyny, przyrządzonej przez wstrząsanie emulsji żółtka jaja w soli fizjologicznej z kaolinem i przesączenie przez filtr Seitza. Wspomniane wyżej preparaty nie są substratami swoistymi i jednorodnymi. Żółtko jaja zawiera cały zespół fosfatydów, z których jedynie lecytyna i w owiele mniejszym stopniu sfingomyeliny są substratami fosfolipazy *C*. Inne fosfatydy działają tutaj hamująco. W przypadku zatem nieoczyszczonych emulsji jaja trudno uzyskać odtwarzalne wyniki. Dodatkowym utrudnieniem jest niejednakowa zdolność tworzenia emulsji przez preparaty żółtkowe.

Z tych względów w naszych pracach badawczych postanowiliśmy posługiwać się substratem całkowicie jednorodnym, swoistym i trwałym: oczyszczoną lecytyną. Dla naszych celów nie wystarczał stopień oczyszczenia lecytyny uzyskiwany w ogólnym toku preparatyki tłuszczowców. Po krytycznym przeglądzie dostępnych metod wybrano za punkt wyjścia metodę Pangborn (1951). Metoda ta polega na: 1) szybkim odwadnianiu wyjściowego surowca — żółtka jaja kurzego — bezwodnym aceto-

* Doświadczenia opisane są częścią badań dotowanych przez Komitet Biochemiczny PAN. Badania podjęliśmy przy niezwykle serdecznej pomocy prof. dr H. Meisla, kierownika Zakładu Badania Surowic i Szczepionek PZH, któremu w tym miejscu wyrażamy podziękowanie.

nem w homogenizatorze, 2) ekstrakcji fosfolipidów 95% etanolem, 3) wytworzeniu nierozpuszczalnego w etanolu kompleksu lecytyny z chlorkiem kadmu, 4) oddzieleniu kompleksu przez oziębienie i odsączenie, 5) wielokrotnym wytrąceniu kompleksu z roztworu chloroformowego w 95% etanolu, 6) przeprowadzeniu kompleksu z warstwy eteru naftowego w 80% etanol, 7) wytrąceniu kompleksu z roztworu 80% etanolu przez zagęszczenie w próżni i wymrożenie, 8) rozbiciu kompleksu za pomocą wytrząsania z 30% etanolem, 9) wytrąceniu zanieczyszczeń dodaniem 20% acetonu do roztworu eterowego.

Tak postępując otrzymaliśmy produkt (z przeciętną wydajnością 5 g z 12 żółtek) bezbarwny, o konsystencji masła, zawierający 1,78% N (teoretycznie 1,74%), 4,05% P (oznaczono metodą Eleka 1928, zawartość teoretyczna 3,86%). Stosunek N : P = 0,98 (teoretycznie 1,0) i liczba jodowa (oznaczona metodą Yasudy 1931-32) — 35,6. Preparaty lecytyny przechowywaliśmy w ciemnym szkle w atmosferze azotu pod acetonem. Tak przechowywane nie zmieniają się w ciągu szeregu tygodni. Unikaliśmy w ten sposób w dużym stopniu głównych przyczyn psucia lecytyn, wskutek dostępu tlenu atmosfery i ich hygroskopijności.

WODOROWANIE LECYTYNY

W celu zapewnienia optymalnych warunków w dalszych badaniach postanowiliśmy zbadać przydatność wodorowanej lecytyny jako substratu fosfolipazy *C*. W literaturze nie znaleźliśmy przykładu użycia wodorowanej lecytyny w środowisku wodnym jako substratu fosfolipazy *C* pałeczki zgorzeli gazowej. Przeciwnie Long i Maguire (1953) stwierdzają nawet, że wodorowane lecytyny nie są substratami toksyny *α Cl. Welchii* typ *A*, w środowisku wodnym.

Wodorowanie przeprowadziliśmy w specjalnie skonstruowanym aparacie, składającym się ze źródła wodoru, biurety gazowej i wstrząsanego naczynia reakcyjnego. Lecytynę wodorowano w środowisku całkowicie bezwodnym. Jako katalizatora używano platyny przyrządzonej według Adamsa, Voorhees i Shriner (1948). Mieszaninę reagującą, składającą się z 1 g lecytyny, 0,125 g tlenku platyny w 35 ml bezwodnego etanolu, wstrząsano w atmosferze wodoru przez 3 godziny. Po tym czasie adsorbcja wodoru prawie całkowicie ustawała. Zużycie wodoru na 1 g lecytyny wynosiło 55 ml (w 20° i 760 mm Hg). Roztwór wodorowanej lecytyny po reakcji wodorowania odsączono od katalizatora i odparowywano w próżni. Wydajność około 90%. Wodorowana w ten sposób lecytyna posiada liczbę jodową równą około 2, ma postać krystalicznego, białego preparatu, nie ciemnieje pozostawiona na powietrzu i nie jest hygroskopijna. Tak przygotowaną wodorowaną lecytynę używaliśmy w naszych badaniach.

ILOŚCIOWE OZNACZANIE FOSFOLIPAZY *C*

Dla wykrywania i mianowania toksyny *α* mikrobiolodzy używają trzech metod: 1) doświadczenia na myszach, 2) odczynu hemolitycznego, 3) odczynu lecytowitelinowego. Wszystkie te metody dla biochemicznych naszych badań nie są odpowiednie. Dlatego przedsięwzięto próby adaptacji i poszukiwania metod oznaczania czynności enzymatycznej fosfolipazy *C*.

Zdecydowano się oznaczać uwalnianą w przebiegu reakcji fosfocholinę określając manometrycznie jej grupę kwasową lub określając fosfór po oddzieleniu fosfocholiny od nierozłożonej jeszcze lecytyny.

Podstawą metody manometrycznej (wprowadzonej przez Zamecnika, Brewstera i Lipmanna 1947) jest obserwacja następująca: przy uwalnianiu fosfocholiny z lecytyny w atmosferze CO_2 i w środowisku zbuforowanym przez bufor dwuwęglanowy (*pH* 7) uwalnia się jedna cząsteczka dwutlenku węgla ze środowiska płynnego. Postęp reakcji mierzymy oznaczając w stałej objętości wzrost ciśnienia dwutlenku węgla.

Metoda manometryczna ma poważne braki: pomiary należy dokonywać w stałym *pH*. Dlatego też opracowaliśmy metodę chemiczną oznaczania czynności fosfolipazy *C*. Lecytyna pod wpływem fosfolipazy *C* rozpada się na fosfocholinę i dwugliceryd. Oznaczanie dwuglicerydu w obecności lecytyny nastręczałoby duże trudności. Dlatego zdecydowano się oznaczać uwalnianą fosfocholinę. Prace przygotowawcze objęły syntezę fosfocholiny i zbadanie jej właściwości *. Emulsję lecytyny oddzielano od fazy wodnej zawierającej fosfocholinę, strącając lecytynę jako kompleks lecytynobiałka utworzony z dodaną do układu reagującego albuminą. Po strąceniu kwasem trójchlorooctowym i przesączeniu otrzymaliśmy roztwór fosfocholiny wolny od lecytyny.

Uwolnioną fosfocholinę spalaliśmy mieszaniną kwasu siarkowego, nadchlorowego i azotowego. Po spaleniu oznaczaliśmy uwolniony nieorganiczny fosfór metodą Fiske i Subbarow (1925).

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ PRZY UŻYCIU LECYTYNY WODOROWANEJ

Zarówno przy użyciu metody manometrycznej, jak i chemicznej okazało się, że lecytyna wodorowana jest substratem fosfolipazy *C*. Odpowiednie ilości lecytyny wodorowanej są w nieco mniejszym stopniu zużywane jako substrat fosfolipazy *C*.

Przy użyciu metody chemicznej wykazaliśmy, że stężenie substratu lecytyny niewodorowanej, odpowiadające połowie szybkości maksymalnej reakcji, wynosi $K_s = 2{,}94 \cdot 10^{-5}$ M. a dla lecytyny wodorowanej wynosi $K_s = 4{,}05 \cdot 10^{-5}$ M. Wpływ *pH* na przebieg reakcji przy użyciu lecytyny wodorowanej zbliżony jest do wpływu *pH* w przypadku użycia jako substratu lecytyny niewodorowanej. To samo odnosi się do wpływu czasu reakcji. Otrzymane wyniki wskazują na to, że użycie w dalszych naszych studiach lecytyny wodorowanej jako dogodnego i trwałego substratu fosfolipazy *C* jest całkowicie usprawiedliwione.

LITERATURA

1. Adams R., Voorhees V. a. Shriner R. L., 1948: Organic Synthesis, vol. I. Wiley a. Sons, New York.
2. Elek A., 1928: *J. Amer. Chem. Soc.*, **50**: 1213.
3. Fiske C. H., a. Subbarow Y., 1925: *J. Biol. Chem.*, **66**.
4. Heyningen van W. E. a. Bidwell E., 1948: *Biochem. J.*, **42**:130.
5. Long C. a. Maguire M. F., 1953: *Biochem J.*, **55**: XV.

* Wyniki tych wstępnych prac ogłoszone zostaną w Rocznikach PZH.

6. Pangborn M. C., 1951: *J. Biol. Chem.*, **188**:471.
7. Yasuda M., 1931 - 1932: *J. Biol. Chem.*, **94**:401.
8. Zamecnik P. C., Brewster L. E., a. Lipmann E., 1947: *J. Exp. Med.*, 85:381.

J. Meduski, A. Zbrożyna, A. Zakrzewska and *D. Olkowska*

STUDIES ON THE PHOSPHOLIPASE C OF *CL. PERFRINGENS* TYPE *A*. SATURATED LECITHINS AS SUBSTRATE OF PHOSPHOLIPASE C IN AN AQUEOUS MEDIUM

Summary

The action of phospholipase C of *Cl. perfringens* type *A* on saturated lecithins in an aqueous medium has been studied. It has been shown, using two independent assay systems (manometric and chemical one), that phospholipase C preparation can attack saturated lecithins in an aqueous medium.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 77 - 78

H. Meisel i *H. Albrycht*

WPŁYW GLIKOZY, *pH* I ŻELAZA NA POWSTAWANIE LECYTYNAZY W HODOWLACH LASECZEK Z GRUPY *PERFRINGENS*

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

W przebiegu badań nad powstawaniem lecytynazy w hodowlach laseczek z grupy *Clostridium perfringens* w różnych podłożach stwierdzono, że pojawianie się tego enzymu jest niezależne od obecności glikozy w podłożu. Zjawisko to wymagało bliższego zbadania.

Do doświadczeń niniejszych użyto jako podstawowego podłoża bulionu z wyciągu z serca bydlęcego o *pH* 7,0 po sterylizacji. W zależności od założeń doświadczenia uzupełniano podłoże rozmaitymi składnikami. Bulion rozlewano do probówek po 35-40 ml. Doświadczenie wykonano z 11 szczepami *Cl. perfringens* różnych typów. *Inoculum* wynosiło zawsze 0,1 ml 18-godzinnej hodowli w podłożu Wrzoska. Po zasianiu wstawiano podłoża doświadczalne na 18 godzin do 37°, po czym po odwirowaniu oznaczano najmniejszą dawkę dającą dodatni odczyn lecytowitelinowy (*Dma*).

Doświadczenia powtarzano często wielokrotnie, cyfry podane obecnie są przeciętnymi. Równolegle z badaniem płynów hodowli eksperymentalnych zawsze badano płyny hodowli kontrolnych. Chcąc uzyskać wyraźne wyniki przyjęto jako dawkę glikozy 0,8%.

Porównawcze doświadczenia wykazały, że najmniejsza dawka aktywna (*Dma*) płynów hodowli znanych szczepów typu *A* w bulionie zwykłym wynosi przeciętnie: dla szczepu *BP6K* — 0,0011 ml, *Lechien* — 0,006 ml, *SR12* i *F2* — po 0,003 ml. *Dma* w płynach hodowli w bulionie z glikozą wynosiła zaś dla szczepów: *BP6K* — 0,02 ml, *Lechien* — 0,013 ml, *F2* — 0,003 ml. Szczep *SR12*, jak i wszystkie inne szczepy badane, nie wytwarzał lecytynazy w bulionie z glikozą lub wytwarzał co najwyżej jej ślady. Stwierdzono zatem, że wytwarzanie lecytynazy nie tylko nie jest zależne od obecności glikozy, lecz że jej dodatek hamuje przeważnie wytwarzanie tego enzymu.

Przyczyny dopatrywano się w zakwaszeniu podłoża. Stwierdzono, że *pH* w bulionie zwykłym waha się przeciętnie w granicach 5.8 - 6.3, w hodowlach w bulionie z cukrem gronowym — 4,2 - 5,7.

Dla kontroli:

1) Wysiano wszystkie szczepy na podłoża o *pH* 6.0, 7.0 i 8.0. Wzrost szczepów był zawsze dobry. W podłożach o *pH* 6.0 wiele szczepów wytwarzało lecytynazę równej mocy jak w podłożach o *pH* 7.0.

2) Do podłoży dodano węglanu wapnia. W bulionie z cukrem gronowym wszystkie szczepy wytwarzały silniejszą lecytynazę. *pH* wzrosło i wahało się w granicach 5,1 - 7,0.

3) Do wszystkich podłoży dodano buforu fosforanowego. W bulionie z cukrem gronowym wszystkie szczepy wytwarzały silną lecytynazę. *pH* wahało się w granicach 5,7 - 6,4. Jednocześnie w buforowanych bulionach zwykłych nastąpiło zahamowanie wytwarzania się lecytynazy, mimo że *pH* wahało się w granicach 6,7 - 7,0.

Aktywujące działanie węglanu wapnia nie było następstwem działania jonów wapnia lub powstającego CO_2.

Przebieg doświadczeń z podłożami uzupełnionymi przez bufor fosforanowy nie wykluczał, iż obok działania kwasoty nie wchodzi tu w grę jeszcze inny mechanizm działania. Gdy glikozę w bulionie zastąpiono przez pyrogronian sodu, poziom wytworzonej lecytynazy był przeważnie taki sam jak w bulionie bez glikozy lub nieco wyższy.

Jak należało oczekiwać, dodatek KCN do podłoży nie miał znaczenia dla wytwarzania lecytynazy. Dodatek fluorku sodu do bulionu zwykłego lub z glikozą również nie wpływał na powstawanie enzymu.

Gdy z podłoży usunięto żelazo przez dodatek *a.a*-dwupirydylu, ulegał zahamowaniu wzrost komórek bakteryjnych. W podłożach z *a.a*-dwupirydylem i dodatkiem $FeCl_3$ wzrost był bujny i komórki wytwarzały toksynę. Dodatek trójwartościowego żelaza do podłoży nieodżelazionych nie powodował wzrostu aktywności toksyny.

Г. Мейзель, Г. Альбрихт

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ И ЖЕЛЕЗА НА ПРОДУКЦИЮ ЛИПАЗЫ КУЛЬТУРАМИ ПАЛОЧЕК ИЗ ГРУППЫ *PERFRIN GENS*

Резюме

Установлено что образование токсина в культурах с глюкозой вызывалось подкислением среды. Добавление углекислого кальция активировало образование лецитиназа, причем это происходило лучше всего в питательной среде, содержащей глюкозу. На образование лецитиназа кроме глюкозы действовала положительно натриевая соль пировиноградной кислоты. Примесь соли железа в контрольной среде не влияла на количество образовавшегося токсина. Удаление железа из среды привело к заторможению роста.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 79 - 80

H. Meisel i *D. Rymkiewicz*

ANTYGENOWE WŁAŚCIWOŚCI ZARODNIKÓW WYTWARZANYCH PRZEZ LASECZKI TĘŻCA

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Doświadczenia nasze miały na celu stwierdzenie, jak przedstawia się problem właściwości antygenowych u zarodników laseczek tężca.

Do doświadczeń użyto 6 szczepów *Cl. tetani*, prowadzonych w Muzeum PZH pod numerami: *78, 138, 139, 364, 382, 383.* Surowice przygotowywano przez uodparnianie królików zawiesiną zarodników szczepu *364* i *383.* Termorezystencja tych szczepów przedstawia się następująco: zarodniki szczepu *364* wytrzymują ogrzewanie w 100° przez 1 godzinę, *383* — przez 30 minut.

PRZYGOTOWANIE ZAWIESINY ZARODNIKÓW DO UODPARNIANIA

Hodowlę 24-godzinną laseczek tężca wysiewano na bulion zwykły. Po 48 godzinach hodowli w 37° pozostawiano probówki w temperaturze pokojowej przez okres 2 dni, po czym zarodniki odwirowywano i dwukrotnie przepłukiwano osad fizjologicznym roztworem NaCl. Ilość zarodników w gotowej zawiesinie wynosiła przeważnie 50 000 - 100 000 w ml. Poszczególne zawiesiny poddawano ogrzewaniu w temp. 70 - 100° przez okres od 10 minut do 3 godzin.

UODPARNIANIE KRÓLIKÓW

Zawiesiny zarodników wstrzykiwano królikom dożylnie w odstępach 5-dniowych w dawkach od 5000 lub 10 000 zarodników począwszy. Przy kolejnych wstrzykiwaniach zwiększano ilość zarodników. Króliki otrzymywały przeciętnie 5 dawek, po czym kontrolowano poziom przeciwciał aglutynacyjnych po próbnym upuście. Przeważnie zachodziła konieczność dodania 2 - 3 dawek przed ostatecznym wykrwawieniem.

ODCZYN AGLUTYNACYJNY

Odczyny aglutynacyjne wykonywano przy użyciu następujących zawiesin: 1) 24-godzinna hodowla laseczek tężca zabitych działaniem formaldehydu w 37° (antygen H). 2) 24-godzinna hodowla laseczek tężca, ogrzana w 100° przez 3 godziny (antygen O). 3) zawiesina zarodników używana do uodparniania, ogrzana w 70° przez 10 minut. Probówki wstawiano na 4 godziny do 37°, a po odczytaniu wyników pozostawiano do następnego dnia w temperaturze pokojowej i kontrolowano odczyny po raz drugi.

WYSYCANIE SUROWIC

Odczyny aglutynacyjne wykonywano z surowicami nie wysyconymi i wysyconymi przy pomocy zawiesiny 24-godzinnych żywych, wegetatywnych komórek. Wysycano również surowice 24-godzinną hodowlą ogrzaną w 100° przez 3 godziny.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

U wszystkich królików uodparnianych zawiesinami zarodników, przygotowywanymi w sposób wyżej wspomniany, stwierdzono w ślad za uod-

parnianiem pojawienie się ciał aglutynujących w surowicy. U królików nie uodparnianych — aglutynin nie stwierdzono.

Bez względu na intensywność ogrzewania zawiesiny (10 min. - 3 godz.), wstrzykiwane zarodniki pobudzały zwierzęta do wytwarzania przeciwciał aglutynujących silnie antygen H, antygen O i zarodniki homologicznego szczepu. Miano aglutynujących surowic w stosunku do antygenu H zmniejszało się proporcjonalnie do stopnia ogrzewania zarodników użytych do uodparniania. Miano surowic w stosunku do homologicznego antygenu O u jednej z surowic (*383*) opadało również odwrotnie proporcjonalnie do intensywności ogrzewania zarodników użytych do uodparniania; u innej (*364*) — nie wykazywało wyraźnych wahań. Miano surowic w stosunku do zarodników homologicznego szczepu pozostawało identyczne, bez względu na to jak długo ogrzewano zawiesiny użyte do uodparniania. Miana aglutacyjne ze szczepami heterologicznymi laseczek tężca (antygen H, O i zarodniki) były wielokrotnie niższe aniżeli z antygenami homologicznymi.

Wysycenie przy pomocy młodych, żywych komórek usuwało aglutyniny dla heterologicznych i homologicznych antygenów H i O oraz obniżało miano dla zarodników heterologicznych laseczek tężcowych. Nie zmieniało miana aglutynacyjnego dla homologicznych zarodników.

WNIOSKI

Zarodniki laseczek tężca przedstawiają dobry aglutynogen, pobudzający uodparniane zwierzę do wytwarzania aglutynin. Zarodniki są dobrym antygenem w makroskopowych odczynach aglutynacyjnych. Ogrzewanie zarodników przez czas dłuższy niż to odpowiada ich termorezystencji nie pozbawia ich właściwości antygenowych.

Uodparnianie zarodnikami pobudza powstanie przeciwciał aglutynujących homologiczne zarodniki a ponadto pobudza zwierzęta do wytwarzania przeciwciał aglutynujących antygen rzęskowy i somatyczny komórek wegetatywnych homologicznego szczepu. Intensywne długotrwałe ogrzewanie zarodników pociąga za sobą pewne obniżenie miana aglutynującego surowicy w stosunku do antygenów komórek wegetatywnych. Surowice sporządzone przy pomocy zarodników z jednego szczepu (typu) laseczek tężca aglutynują w słabym i nieznacznym stopniu antygeny szczepów laseczki tężca typów heterologicznych. Drogą wysycania surowic można uzyskać surowice aglutynujące wyłącznie homologiczne zarodniki.

Г. Мейзель, Д. Рымкевич

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА СПОР МИКРОБОВ СТОЛБНЯКА

Резюме

Споры палочек столбняка являются хорошим агглютиногеном. Они содержат так жгутиковый, как и соматический антиген, характерный для вегетативной формы бациллов. Антигенные свойства спор не подвергаются разрушению даже при длительном нагревании.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 81 - 84

Z. Szynkiewicz

PŁYNNA WZBOGACAJĄCA POŻYWKA Z ŻÓŁTKIEM JAJA KURZEGO DO HODOWLI WŁOSKOWCÓW RÓŻYCY

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW w Warszawie

Otrzymanie dobrej pożywki, dającej maksymalną ilość bakterii w jednym mililitrze oraz zawierającej wszystkie potrzebne dla wzrostu drobnoustrojów składniki, jest koniecznym wstępem do badań nad produkcją biopreparatów, badań diagnostycznych oraz zagadnień z dziedziny fizjologii drobnoustrojów.

Dlatego też podjęto badania (ogłoszone w streszczeniu na XI Zjeździe Mikrobiologów w 1951 r.) w celu uzyskania pożywki dającej maksymalny wzrost bakterii. Jako podłoża podstawowego użyto bulionu z mięsa końskiego sterylizowanego przy ciśnieniu nie wyższym niż 0,75 atm, z dodatkiem 1% peptonu 0,5 NaCl, o *pH* 7,6 - 7,8. Do pożywki dodawano różnych składników mogących pobudzać wzrost, jak surowica końska, mleko oraz żółtko jaja kurzego, przygotowane jak do pożywki Besredki. Prócz tego zastosowano pożywkę Hutnera składającą się z soli nieorganicznych, peptonu, wyciągu drożdżowego, kwasu olejowego zmydlonego NaOH oraz saponiny, ponadto pożywkę z kwasem olejowym zmydlonym, osobno lub łącznie z saponiną. Za miarę przydatności pożywki przyjmowano ilość bakterii w 1 mililitrze, liczoną metodą Kocha lub przez porównanie zmętnienia ze skalą zmętnień przygotowaną dla włoskowców różycy.

W szeregu doświadczeń uzyskano następujące dane (pożywka: bulion z dodatkiem 1% glikozy, 0,5 $NaHPO_4$, *pH* 7,8):

Dodatki do pożywki	Natężenie wzrostu w mln komórek na 1 ml podłoża
5% surowicy końskiej	1000
10% pożywki Besredki	5000
5% pożywki Besredki	2500 - 3500
pożywka Hutnera bez saponiny	poniżej 500
pożywka Hutnera z saponiną	poniżej 250
pożywka podstawowa z mlekiem	pożywka podczas wzrostu uległa wykłaczeniu, co uniemożliwiło ilościowe określenie drobnoustrojów, jednak w polu widzenia mikroskopu widać było duże ilości pałeczek

Z przytoczonego zestawienia widzimy, że najbujniejszy wzrost dała pożywka zawierająca 1% glukozy, 0,5% Na_2HPO_4 (bulion), z dodatkiem 5 - 10% żółtka jaja kurzego w postaci pożywki Besredki.

Pożywka z dodatkiem surowicy dawała też dobry wzrost, jednak surowice poszczególnych koni dawały bardzo duży rozrzut wyników, począwszy od około 1 miliarda drobnoustrojów na 1 ml aż do ilości uzyskiwanych jedynie przy dodatku żółtka jaja kurzego.

Wobec tego zaczęto stosować jako pożywkę bulion z 1% glikozy, 0,5% Na_2HPO_4, o *pH* 7,8 - 8,2, z dodatkiem żółtka jaja kurzego. Żółtko jaja wybijano na bibułę filtracyjną, po oddzieleniu białka wlewano je do cylindra, zalewano 100 ml wody destylowanej i dodawano 10% NaOH, aż do przejaśnienia pożywki. Następnie dodawano jeszcze 0,3 ml 10% NaOH, dopełniano wodą do 400 ml i sterylizowano przy 0,75 atm przez 25 minut. Ilość komórek bakteryjnych w 1 ml pożywki podstawowej z dodatkiem 7% żółtka jaja kurzego podaje poniższe zestawienie:

Szczep włoskowca różycy	Ilość komórek bakteryjnych po 20-godzinnej inkubacji (liczona metodą Kocha)
38	4 600 000 000
40	6 000 000 000
53	5 400 000 000

Doświadczenia powtórzono z innymi szczepami na pożywce o składzie jak powyżej, lecz jedynie z dodatkiem 5% pożywki Besredki.

Kontrolę wyników przeprowadziła dr Stefanowa z W.Z.H.W. w Stalinogrodzie. Uzyskane tam wyniki podaję poniżej, z zaznaczeniem, że przesiewy na płytki były wykonane dopiero po 7 dniach od chwili wyjęcia kultury z termostatu:

Szczep	Średnia ilość komórek bekteryjnych w 1 ml uzyskana z 4 płytek
558	$261 \cdot 10^7$
598	$477 \cdot 10^7$
534	$144 \cdot 10^7$
534a	$371 \cdot 10^7$

Kultury włoskowca na pożywce z żółtkiem w czasie wzrostu i spadku *pH*, najczęściej po 24 godzinach, wykłaczają się samorzutnie. Wyniki uzyskane w przeliczeniu metodą Kocha i przy określaniu ilości ciał bakteryjnych na podstawie zmętnienia pokrywały się.

Następnie badano wzrost włoskowców różycy na pożywce podstawowej z dodatkiem do 50% żółtka jaja kurzego. Na pożywkę podstawową z dodatkiem 10% żółtka jaja kurzego wysiano 19 różnych szczepów włoskowców różycy. 2 z tych szczepów dały wzrost 3,7 razy obfitszy niż w bulionie, 2 - 8,3 razy, 2 - 10,0 razy, 2 - 12,5 razy obfitszy.

Maksymalnej ilości drobnoustrojów w pożywce nie można było określić, ponieważ skala była mianowana jedynie do 5 miliardów. Najlepszy wzrost uzyskano przy dodatku żółtka w ilości 5 - 7%. Pożywka, na której wyrastały włoskowce różycy, ulegała silnemu zakwaszeniu do *pH* 3,5, dlatego też ilość komórek bakteryjnych szybko z czasem malała. W celu zmniejszenia zakwaszenia zaczęto zmniejszać stężenie glikozy w pożywce. Przy stężeniu 0,75% glikozy wzrost był podobny jak przy stężeniu 1%. Gdy ilość glikozy zmniejszono do 0,5%, dwa szczepy włoskowców różycy dały identyczny wzrost jak z pożywką zawierającą 1% glikozy, dwa szczepy dały plon niższy o 0,5 miliarda komórek bakteryjnych, a jeden szczep o 1 miliard.

Próbowano również zastąpić glikozę maltozą, laktozą, sachorozą, lewulozą. Jedynie dodatek laktozy dawał wzrost zbliżony do uzyskanego na pożywce z glikozą.

Bez skutku próbowano zmniejszyć zakwaszenie podłoża przez dodatek do podłoża kawałka marmuru.

Roztwory żółtka, zakwaszane kwasem octowym w ilości 2 ml na 100 ml roztworu, stymulowały wzrost włoskowca podobnie jak roztwory alkaliczne.

W dalszych doświadczeniach obliczano ilość komórek bakteryjnych metodą Kocha. W rezultacie możemy stwierdzić, że na pożywce z żółtkiem uzyskujemy wzrost 10 - 30 razy obfitszy niż na zwykłym bulionie. Dotyczy to zjadliwych szczepów terenowych. Natomiast szczep niezjadliwy Stauba dał wzrost słaby ($146 \cdot 10^7$ komórek w 1 ml, tj. tylko 5-krotnie bujniejszy od wzrostu na zwykłym bulionie).

W granicach *pH* pożywki od 7,6 do 7,9 nie zauważono różnic natężenia wzrostu.

W celu sprawdzenia uzyskanych poprzednio wyników wysiano na pożywkę z żółtkiem 23 szczepy włoskowca różnego pochodzenia, łącznie ze szczepami typu *A* i *B* sprowadzonymi z Węgier. Wszystkie badane szczepy dały po 18 - 20-godzinnej inkubacji obfity wzrost (zmętnienie odpowiadające 5 miliardom bakterii).

Pożywki nie można sterylizować po dodaniu żółtka, ponieważ ulega ona wykłaczeniu, nawet przy *pH* 11.

Dodatek żółtka i glikozy do agaru odżywczego powodował jego wzbogacenie w tym sensie, że kolonie były większe.

W preparacie mikroskopowym z kultury wyrosłej na pożywce podstawowej z dodatkiem żółtka widziano najczęściej krótkie pałeczki intensywnie barwiące się metodą Grama, w starszych kulturach przeważały włoskowce proste, 2 - 3 razy dłuższe. Oprócz tych typowych postaci występowały formy długie, skręcone, z ziarnistościami.

Ostateczny skład proponowanej pożywki przedstawiałby się jak następuje: bulion z dodatkiem 1% glikozy, 0,1% Na_2HPO_4, o *pH* 7,9 - 8 i 7% żółtka przygotowanego jak wyżej.

LITERATURA

1. Szynkiewicz Z., 1952: Podłoże płynne wzbogacające z żółtkiem jaja kurzego do hodowli wł. różycy. *Med. Dośw. Mikr.*, *3*:325.

Z. *Szynkiewicz*

LIQUID EGG-YOLK CULTURE MEDIUM FOR *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

Summary

The medium contains pepton (1%), Na_2HPO_4 (0,5%), glucose (1%), Besredka culture medium from egg-yolk (7%) in horse meat extract, *pH*: 7,8 - 8,0.

E. rhusiopathiae grows in this medium abundantly. The yields up to 6.10^9 cells per 1 ml were received.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 85 - 87

Z. Szynkiewicz

CZYNNIK WZROSTOWY DLA WŁOSKOWCÓW RÓŻYCY ZAWARTY W EKSTRAKTACH ALKOHOLOWYCH I ACETONOWYCH ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO

Z Katedry Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW w Warszawie

Opierając się na poprzednich badaniach, w których udowodniono, że dodatek żółtka jaja kurzego stymuluje wybitnie wzrost włoskowców różycy, zaczęto poszukiwać czynnika decydującego o tym zjawisku.

Ażeby wykluczyć wpływ witamin, dodawano kolejno do normalnej pożywki (bulionu) czynniki wzrostowe: ryboflawinę, tiaminę, pirydoksynę, kwas nikotynowy, pantotenian wapnia oraz biotynę. Dodatek tych substancji nie pobudził wzrostu, a otrzymane różnice pozostawały w granicach błędu.

Na podstawie danych teoretycznych wykluczono jako czynnik wzrostowy witaminę D i A, gdyż własności stymulujące żółtka nie ulegały zniszczeniu przy sterylizacji w odczynie zasadowym nawet w 120°.

W celu zbadania jaki związek chemiczny odgrywa tu rolę, żółtko jaja kurzego frakcjonowano. W tym celu przygotowano je w podobny sposób jak do pożywki Besredki, zakwaszano kwasem octowym i wytrącano frakcje w różnych *pH*. Następnie płyn odwirowywano przy 13 500 obr./min, osad rozpuszczano w słabym roztworze NaOH. Frakcje te dawały typowe reakcje na białko i węglowodany. Z ostatecznego przesącza izolowano dalsze frakcje wytrącając je etanolem. Z 10 otrzymanych frakcji 3 pobudzały wzrost włoskowca. Przesącze, zarówno po wytrąceniu kwasem octowym poszczególnych frakcji, jak i po koagulacji białek przy niskim *pH* w temperaturze 110°, nie stymulowały wzrostu włoskowców. Przy dalszym rozdzielaniu czynne frakcje utraciły swoje właściwości. Wydzielano z nich minimalne ilości frakcji tłuszczowych, których nie można było poddać analizie z powodu zbyt małej ilości. Frakcje węglowodanowe i białkowe, wytrącane etanolem, nie pobudzały wzrostu włoskowców różycy.

Roztwór żółtka dializowano w wodzie bieżącej przez 24 godziny. Drugą porcję żółtka zakwaszano do punktu izoelektrycznego, wytrącając większość białek. Przesącz żółtka jaja okazał się nieczynny, natomiast dializa minimalnie obniżała jego aktywność.

Z kolei izolowano frakcje lipidowe za pomocą ekstrakcji acetonem, alkoholem i chloroformem. Rozpuszczalniki odparowywano w próżni. Lipidy w niezmienionej postaci raczej hamowały wzrost. Wobec powyższego zmydlano je słabymi roztworami NaOH. W szeregu doświadczeń

uzyskano wybitną poprawę wzrostu. W preparatach z wyrosłych kultur widziano kilka lub kilkanaście razy więcej drobnoustrojów niż w kontrolnym bulionie. W wypadku słabo zaznaczonej różnicy wzrostu liczono ilość komórek bakteryjnych metodą Kocha; np. w jednym przypadku bulion kontrolny zawierał $185 \cdot 10^6$, a ten sam bulion z dodatkiem zmydlonego ekstraktu $865 \cdot 10^6$ bakterii/ml. W szeregu doświadczeń efekt ten powtarzał się.

Tabela I

Wzrost włoskowca na różnych podłożach (w mln komórek na 1 ml)

Szczep	Żółtko jaja w roztworze	Ekstrakt niezmydlony	Ekstrakt alk. zmydlony	Ekstrakt acet. zmydlony	Oleinian Na	Bulion
715	3 000	—	1.500	1.000	300	300
M 12	0	—	1.500	1.000	300	300
540	5 000	—	1.500	1.000	0	300
M 1/3	5 000	—	2.000 — 2.500	1.500	0	300

Z tabeli I wynika, że ekstrakty niezmydlone hamowały wzrost, a zmydlone pobudzały go, jednak słabiej niż roztwór żółtka. Dodanie do ekstraktów stężonego HCl, nawet w małej ilości, powodowało zestalanie jego i inaktywację. Ekstrakty żółtka stymulowały wzrost w rozcieńczeniach 10^{-3} - 10^{-6}. Roztwór czterokrotnie bardziej stężony niż dodawany do pożywki nie dawał reakcji na białko, dawał słabą reakcję Molischa (co raczej możnaby tłumaczyć zanieczyszczeniem) oraz ujemną reakcję Schiffa.

W ekstraktach czterokrotnie stężonych oznaczano azot całkowity metodą mikro-Kjeldahla w modyfikacji Parnas-Wagnera. Ilość azotu w ekstraktach acetonowych wahała się w granicach od 0 do 0,225 mg/ml, w alkoholowych — w granicach od 0 do 0,061 mg/ml. Roztwór żółtka jaja zawierał przeciętnie około 0,9 - 1 N mg/ml.

Surowica końska, słabiej pobudzająca wzrost, zawierała 8,8 N mg/ml.

Ekstrakty żółtka dawały się zmydlać słabymi roztworami NaOH, przy czym nieczynna frakcja w postaci niezmydlonej dawała się łatwo oddzielić. Stężenia Na OH równe lub większe od 1% inaktywowały je. Ekstrakty przechowywane przez dłuższy czas w lodówce traciły aktywność przechodząc często w galaretowatą masę.

Tabela II

Wzrost włoskowca różycy szczepu *127* (w mln na 1 ml podłoża)

Oleinian sodu w mg na 100 ml		Ekstrakt chloroformowy żółtka					Żółć bydlęca farmakopealna
2	6	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	
300	300	600	600	800	1.200	1.200	800

W związku z badaniami Hutnera, który uważał, że czynnikiem wzrostowym dla włoskowców różycy jest kwas olejowy, stosowano go porównawczo w postaci zmydlonej lub w postaci *Natrium oleinicum purissimum*, zarówno z saponiną jak i bez niej. Nie uzyskano poprawy wzrostu. Również nie można było zastąpić ekstraktu dezoksycholanem sodu i kwa-

sem cholowym. Uzyskano natomiast wyraźną poprawę wzrostu przy dodatku ekstraktu alkoholowego żółci bydlęcej, żółci bydlęcej farmakopealnej czystej oraz proszku bydlęcej żółci dla celów bakteriologicznych.

Przypuszczalnie czynnik wzrostowy zawarty w ekstraktach żółtka jaja kurzego jest jakimś lipidem, mieszaniną zmydlonych nienasyconych kwasów tłuszczowych lub nienasyconym kwasem tłuszczowym, co jednak wydaje się raczej wątpliwe. Z tego względu można przypuszczać, że jest to witamina F.F. lub jakiś nowy czynnik wzrostowy.

Należałoby jeszcze wykluczyć sterole jako czynnik wzrostowy.

LITERATURA

1. Brill J. i Szynkiewicz Z., 1955: Pożywka płynna wybiórczo namnażająca do hodowli włoskowców różyny świn. *Rocz. Nauk Roln.*, 67:255.
2. Brill J. i Szynkiewicz Z., 1952: Pożywka płynna wybiórczo namnażająca do hodowli włoskowców różycy świń. *Med. Dośw. Mikr.* 3:325.
3. Hutner S. H., 1942: Some growth requirements of *Erysipelothrix* and *Listerella. J. Bact.*, 43:629.
4. Szynkiewicz Z., 1952: Podłoże płynne wzbogacające z żółtkiem jaja kurzego do hodowli włoskowca różycy. *Med. Dośw. Mikr.* 3:325.

Z. Szynkiewicz

GROWTH FACTOR FOR *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* IN ETHANOL AND CHLOROFORM-EXTRACTS OF EGG-YOLK

Summary

It was shown that there is a growth factor in egg-yolk. This factor (or factors) can be extracted with ethanol and chloroform. The extracted substances, when dissolved in 0,1% NaOH, stimulate the growth of *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

The factor is not identical with oleic acid. It seems to be of lipid character and is inactivated by conc. HCl.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 89 - 94

Z. Szynkiewicz

PRÓBY EKONOMICZNEGO WYKORZYSTANIA MIĘSA ODPADKOWEGO DO PRZYGOTOWANIA BULIONU

Z Katedry Mikrobiologi Wydziału Weterynarii SGGW w Warszawie i z Działu Produkcji Zarządu Przemysłu Bioweterynaryjnego w Drwalewie

Wykorzystanie mięsa przy produkcji bulionu jest minimalne, ponieważ do pożywki przechodzi jedynie 7,1% związków azotowych wykrywanych metodą mikro-Kjeldahla. Różne serie wody mięsnej, wyprodukowane nawet w tym samym zakładzie, wykazują duże różnice w zawartości substancji odżywczych.

Wobec powyższego postanowiono zastąpić wodę mięsną hydrolizatem wyprodukowanym doświadczalnie przez Zakłady Bioweterynaryjne w Drwalewie według metody Babicza.

Hydroliza kwaśna uwalnia, a co za tym idzie udostępnia większą ilość aminokwasów czy to w postaci wolnej czy związanej peptydowo.

BADANIA WŁASNE

a) Badania chemiczne.

Otrzymano 4 serie hydrolizatu, *pH* określono potencjometrycznie, ilość azotu organicznego metodą mikro-Kjeldahla.

Nr serii	*pH*	Średnia zawartość N całk. badanych próbek hydrolizatu
1	1,2	491,8 mg %
2	1,37	479,3 „ „
3	1,11	513, „ „
4	1,46	544,2 „ „

Ustalono zawartość azotu chałkowitego metodą mikro-Kjeldahla w bulionie mięsno-peptonowym (B.M.P.W.Z.) o *pH* 7,4 - 7,6. Bulion ten dawał dobry wzrost bakterii.

Zawartość azotu całkowitego w pożywce B.M.P.W.Z.:

Nr próbki	Azot całkowity w mg%
1	193,16
2	193,08
3	175,62

b) Badania biologiczne

Pożywki z hydrolizatów przygotowywano, rozcieńczając je wodą destylowaną, dodając dla celów eksperymentalnych różne substancje, o których mowa poniżej. *pH* pożywek ustalano na 7,4 - 7,6, posługując się roztworem czerwieni fenolowej. Pożywkę gotowano lub wstawiano do autoklawu i sterylizowano pod ciśnieniem 0,5 atm w celu strącenia osadu. Następnie pożywkę filtrowano, rozlewano do probówek i sterylizowano przy ciśnieniu 0,75 atm przez 20 minut. Podłoże agarowe przygotowywano podobnie, z tym, że zamiast filtrowania zlewano klarowny płyn z nad osadu. Przydatność pożywki dla wzrostu bakterii badano przez zasiewanie różnych drobnoustrojów chorobotwórczych. Wszystkie doświadczenia powtarzano kilkakrotnie. Dla porównania intensywności wzrostu w każdym doświadczeniu wysiewano bakterie na buliony B.M.P.W.Z. i pożywkę agarową A.M.P.W.Z. (agar mięsno-peptonowy, wyciąg zimny).

Wzrost bakterii, rosnących w postaci jednolitego zmętnienia, porównywano z wzorcową skalą zmętnień przygotowaną z zawiesiny włoskowców różycy. Wzrost bakterii, które rosły w postaci kożuszków, z braku innej metody określano wielkością osadu powstałego na dnie probówki po skłóceniu. Pożywki zasiewano pipetą pasteurowską lub ezą młodymi, 24-godzinnymi kulturami bulionowymi, a w doświadczeniu pierwszym kulturami agarowymi. Za miarę wzrostu bakterii na pożywkach agarowych przyjmowano ilość i wielkość kolonii.

Stosowano (zob. tabele) następującą skalę wzrostu: bardzo słaby (1), średni (2), dobry (3), bardzo dobry (4), brak wzrostu (—), wzrost wątpliwy (+—), nie badano (0).

Tabela I

Wzrost bakterii na pożywce płynnej o *pH* 7,4 zawierającej rozcieńczony hydrolizat serii I bez żadnych dodatkowych substancji

Growth of bacteria on liquid medium containing only diluted meat hydrolysate *pH* 7,4

Szczep Strain	Hydrolizat rozcieńczony Dilution of meat hydrolysate					
	do 164 mg % N		do 120 mg % N		do 98 mg % N	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Escherichia coli	3	3	2	2	2	2
Staphylococcus aureus	2	2	1	1	1	1
S. albus	3	3	1	1	1	1
E. coli Wramby	3	3	1	1	2	2
Streptococcus pyogenes Nr 10	1	1	1	1	1	1
Str. pyogenes Nr 14	0	0	—	—	—	
Pasteurella avicida	2	2	1	1	2	2
Pasteurella avicida 17	1	1	2	2	2	2
Erysipelothrix rhusiopathiae 425	1	1	—	—	—	-

Jak z powyższego wynika, nawet sam hydrolizat rozcieńczony wodą destylowaną i zneutralizowany do *pH* 7,4 daje średnie lub słabe wzrosty większości bakterii. Jeden szczep paciorkowca hemolitycznego i jeden włoskowca różycy nie wyrosły wcale. Do dalszych badań użyto hydrolizatu z różnymi stosowanymi zwykle w bakteriologii składnikami jak: pepton „Bacutil", glicerol, sól kuchenna, fosforan dwuzasadowy.

Przeprowadzono szereg badań, których z braku miejsca nie przytaczam. Badania te wykazały, że pożywki agarowe przygotowane z hydrolizatu mięsa dały, niezależnie od rodzaju dodanych substancji (glicerol,

fosforany, sól kuchenna), dostatecznie dobry wzrost wszystkich bakterii, odpowiadający wzrostowi na pożywkach kontrolnych przygotowanych na A.M.P.W.Z.

Z pożywek hydrolizatowych płynnych najlepszą i najprostszą w przygotowaniu okazała się pożywka 4 H.P.S. (4-krotnie rozcieńczony hydrolizat, pepton). Pożywka ta w porównaniu z pożywką kontrolną przygotowaną na bulionie (B.M.P.W.Z.) dała wyniki nie gorsze, z wyjątkiem 2 szczepów włoskowców różycy (na 3 badane) i jednego szczepu paciorkowca hemolitycznego. Z powyższego powodu nastawiono dalsze badania innych serii hydrolizatów (1, 2, 3, 4), które rozcieńczono do stężenia N całk. w granicach 110 - 128 mg%.

Tabela II

Wzrost bakterii na pożywkach różnych serii
Growth of bacteria on experimental media

Szczep Strain	Seria 1		Seria 2		Seria 3		Seria 4		K	
	H.P.	A.H.P.	H.P.	A.H.P.	H.P.	A.H.P.	H.P.	A.H.P.		
Str. pyogenes 10	1	3	3	3	3	3	2	3	3	3
Str. pyogenes 14	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3
E. rhusiopathiae 426	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
E. coli	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
S. aureus	3	3	0	0	0	3	3	3	3	3
P. avicida 1	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3
P. avicida 179	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Corynebacterium pyogenes 12	1	2	3	0	0	0	0	3	3	3
C. pyogenes 12	1	2	1	2	2	2	2	2	3	3
B. anthracis 11	0	3	0	3	3	3	3	3	3	3
Salmonella dublin	0	3	4	3	3	3	0	0	4	3

Pożywki oznaczone jako H.P. przygotowano z hydrolizatu rozcieńczonego do stężenia azotu 110 - 125 mg%, z dodatkiem 1% peptonu. Pożywki z serii 1 i 4 zawierały mniej azotu niż pozostałe (około 110 mg%), co prawdopodobnie tłumaczy słabszy wzrost bakterii w tych podłożach. Jako kontroli użyto pożywki B.M.P.W.Z. i A.M.P.W.Z.

Wyniki doświadczeń przedstawione w tabeli II świadczą, że wszystkie serie hydrolizatów mają zbliżone własności odżywcze. Jednak wzrost włoskowców różycy był jeszcze ciągle skąpy. Dlatego też dodawano do tej pożywki glicerol, NaCl, lub Na_2HPO_4. Wysiane na te pożywki szczepy włoskowców różycy i szczep *Pasteurella* nie wykazywały specjalnego polepszenia wzrostu.

W celu otrzymania dobrego wzrostu wszystkich użytych do doświadczeń szczepów bakterii postanowiono dodać do pożywki hydrolizat drożdży. Działanie hydrolizatu drożdży na wzrost bakterii uwidacznia tabela III.

Kontrola wzrostu tych samych szczepów na pożywce B.M.P.W.Z. wykazała we wszystkich szczepach zdecydowanie dobry wzrost, a szczególnie w szczepach *6468* i *14*. Trzeba jednak zaznaczyć, że są one od długiego czasu utrzymywane w tej pożywce.

Na pożywkę H.P.S. z dodatkiem hydrolizatu drożdży wysiano jeszcze 20 szczepów włoskowca różycy. Wzrost na tych pożywkach, przygotowanych ze wszystkich serii, był na ogół dobry.

Tabela III

Wpływ hydrolizatu drożdży na wzrost bakterii
Effect of yeast hydrolysate on the growth of bacteria

Szczep Strain	Pożywka H.P.S. Medium H.P.S.		Pożywka H.P.S.D. z dodatkiem hydrolizatu drożdży Medium H.P.S.D. + yeast hydrolysate	
	12h	24h	12h	24h
Str. pyogenes 17	2	2	3	3
P. avicida 1	2	2	3	3
E. rhusiopathiae 6473	2	3	2	3
E. rhusiopathiae 6468	2	2	3	3
„ „ *X*	2	3	2	3
„ „ *14*	2	2	3	3
„ „ *VII*	2	2	2	2
„ „ *B*	1	2	2	3

Tabela IV

Wzrost bakterii na różnych pożywkach agarowych przygotowanych z hydrolizatu Drwalew, 1-procentowego peptonu krajowego, 0,5 procentowego NaCl i 3 procentowego hydrolizatu drożdży.

Growth of bacteria on various agar media containing meat hydrolysate, 1% peptone, 0,5% NaCl, 3% yeast hydrolysate

Szczepy Srain	Ilość szczepów Number of strains examined	Pożywka Medium												
		1	K1	2	K2	3	K3	4	K4	5	K5	6	K6	7
Str. pyogenes	5	3	3	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	3
E. coli	2	3	3	3	3	4	4	4	4	3	0	0	0	3
Salmonella A, B, C	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	3
Pseudomonas aeruginosa	3	4	4	4	4	4	4	4	4	1	1	0	0	3
P. avicida	3	2	2	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	2
S. aureus	2	3	3	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	3
C. pyogenes	4	2	2	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	2
E. rhusiopathiae	19	3	3	±	±	3	3	4	4	0	0	0	0	3
Clostridium chorobotwórcze	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	W	W	0

Objaśnienie symboli pożywek: K — kontrola, 1 — agar odżywczy przygotowany na pożywce H.P.S. + 3% hydr. drożdży, K1 — agar odżywczy przygotowany na pożywce B.M.P.W.Z., 2 — agar Endo przygotowany na pożywce H.P.S. + 3% hydr. drożdży H.P.S.D., K2 — ta sama pożywka przygotowana z B.M.P.W.Z., 3 — agar surowiczy z pożywki H.P.S.D., K3 — agar surowiczy z B.M.P.W.Z., 4 — agar z krwią przygotowany na pożywce H.P.S.D., K4 — ta sama pożywka z B.M.P.W.Z., 5 — pożywka Conradi-Drygalskiego przygotowana z pożywki H.P.S D., K5 — ta sama pożywka przygotowana z B.M.P.W.Z., 6 — agar słupkowy z dodatkiem 1% glikozy przygotowany z pożywki H.P.S.D., K6 — ta sama pożywka przygotowana z B.M.P.W.Z., 7 — pożywka H.P.S.D. (pożywka H.P.S.D., do której dodano 3% hydrolizatu drożdży).

W — wzrost nie dający się określić.

Jak wynika z powyższego, bulion przygotowany z hydrolizatów mięsa i drożdży, rozcieńczonych do zawartości 120 - 128 mg% azotu całkowitego, z dodatkiem 1% peptonu krajowego, 0,3% NaCl, zapewnia zupełnie dobry wzrost wszystkich przebadanych bakterii.

Ilość azotu całkowitego w pożywce z hydrolizatu „Drwalew" badanego metodą mikro-Kjeldahla wynosi:

Ilość badanych próbek	Rozcieńczenie hydrolizatu (wyjściowe do mg % N c.)	Ilość N c. w ostatecznej pożywce H.P.S.D. w mg %
2	110	156-160
4	120-129	183-187

Ilość azotu całkowitego w pożywce H.P.S.D. odpowiada wymaganiom jakie stawia Babicz dobrej pożywce.

Następne doświadczenia miały na celu przygotowanie z powyższego bulionu hydrolizatowego agaru odżywczego i pożywek specjalnych, a mianowicie: agaru z surowicą, agaru z krwią, agaru Conradi-Drygalskiego. Wyniki ilustruje tabela IV.

Widzimy więc, że pożywki agarowe H.P.S.D. nie ustępują analogicznym pożywkom przygotowanym z B.M.P.W.Z. Wynik ten odnosi się do pożywek przygotowanych ze wszystkich serii hydrolizatu, rozcieńczonych do stężenia 120 - 128 mg% N. Z pożywki H.P.S.D. i B.M.P.W.Z. przygotowano również podłoża Wrzoska i Wróblewskiego. Wzrost *Cl. tetani* (2), *Cl. septicum* (1), *Cl. Novyi* (2) wystąpił po normalnym czasie i w normalnym natężeniu.

Sprawdzono również przydatność bulionu odżywczego z hydrolizatu mięsa i drożdży z dodatkiem 0,5%NaCl. Hydrolizat rozcieńczono do stężenia N c. ca 120 - 130 mg%. Jako kontroli użyto pożywki H.P.S.D.

Tabela V

Wzrost bakterii na pożywce z hydrolizatu „Drwalew" z dodatkiem hydrolizatu drożdży oraz 0,5% NaCl

Growth of bacteria in broth with meat hydrolysate „Drwalew" containing yeast hydrolysate and 0,5% of NaCl

Szczepy Strain	Bulion H.DS. Broth H.D.S.	Bulion H.P.S.D. Broth H.P.S.D.
E. coli	3	3
S. aureus	3	3
C. pyogenes 8	2	3
Str. pyogenes 1	2	3
P. avicida 1	2	3
E. rhusiopathiae	2	3
E. rhusiopathiae	1	3

W dalszych badaniach ustalono optymalne warunki produkcji hydrolizatu. Mięso poddano wstępnemu drożdżowaniu, ażeby uniknąć podczas hydrolizy karmelizacji cukru.

Z. Szynkiewicz

MORE ECONOMICAL UTILISATION OF MEAT IN PRODUCTION OF BROTH CULTURE MEDIA FOR BACTERIA

Summary

For the preparing of culture media the author suggests the use of acid hydrolysate of horse meat and yeast autolysate instead of meat extract.

The meat extract can be replaced by the hydrolysate added to medium in the amount equivalent to total nitrogen content 120 - 230 mg%.

The output of the broth per kg of meat is much greater.

All tested bacteria (Table III - V) grow in the media prepared with the meat hydrolysate as well or even better than in commonly used meat extract pepton media. Only exception is *Erysipelothrix rhusiopathiae* growing on this medium less abundantly.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 95 - 98

S. Kałużewski

BADANIA NAD ODCZYNEM FOSFATAZOWYM U RÓŻNYCH GATUNKÓW DROBNOUSTROJÓW

Z Zakładu Bakteriologii AM w Łodzi

Celem pracy było przebadanie wytwarzania fosfatazy *in vitro* przez różne gatunki bakterii zarówno saprofitycznych jak i chorobotwórczych dla człowieka.

Temat ten podjęto ze względu na coraz szersze zastosowanie odczynu fosfatazowego wraz z innymi odczynami mającymi świadczyć o chorobotwórczości takich bakterii jak gronkowce (Barber, Kuper 1951; Barber, Brooksbank, Kuper 1951; Pakuła, Rabczyńska, Załęska 1953), jak również dla stwierdzenia ewentualnej możliwości zastosowania tego odczynu w diagnostyce biochemicznej innych bakterii. Obserwacje ograniczono tylko do zagadnień wyłącznie praktycznych, diagnostycznych.

Fosfatazę wykrywano dodając do podłoży przed wysiewem fosforofenolftaleinian sodu (Ffs).

Wytwarzana przez bakterie fosfataza uwalnia z tego związku fenolftaleinę, której obecność w podłożu stwierdza się po zalkalizowaniu hodowli.

W trakcie niniejszej pracy zasadniczym podłożem, na którym badano wytwarzanie fosfatazy, był bulion mięsno-peptonowy. Do bulionu dodawano jałowy, roztwór substratu w takiej ilości, by uzyskać koncentrację 10 mg%. Wyjściowy 1% roztwór wodny Ffs przygotowano jednorazowo, wyjaławiano przez sączenie i przechowywano w chłodni. Ffs w roztworze przechowywany w ciągu dwu i pół roku nie uległ rozkładowi. Niektórzy autorzy radzą przygotowywać roztwór substratu w buforze fosforanowym.

Do bulionu z odczynnikiem wsiewano badane drobnoustroje pochodzące z hodowli 24-godzinnej. Po 24 godzinach inkubacji hodowlę alkalizowano 10% ługiem sodowym. Przy alkalizacji unikano nadmiaru ługu, ponieważ nadmiar taki powoduje zmniejszenie intensywności, a następnie znikanie czerwonego zabarwienia, co w rezultacie może prowadzić do błędów w odczytywaniu wyników. Odczytywania dokonywano bezpośrednio po alkalizacji. Wynik oceniano na podstawie intensywności barwy czerwonej (na ±, +, ++, +++), przyjmując za trzy plusy obraz uzyskiwany po 24-godzinnej inkubacji wzorcowego szczepu gronkowca w obecności substratu w stężeniu 10 mg%. Ocenę wyniku w przypadku uwolnienia nieznacznej ilości fenoftaleiny utrudniało naturalne zabarwienie bulionu. Niedogodność tę usunięto przez wprowadzenie podłoża bezbarwnego (płyn Tyroda, 0,75% pepton w roztworze wodnym i substrat) i opracowanie czterostopniowej wzorcowej skali barwnej, co pozwoliło na dokładniejszą ocenę wyników.

Odczytywanie wykonywano w komparatorze, w którym eliminowano różnicę między hodowlą a wzorcem wynikającą ze zmętnienia hodowli. Zalecana przez innych autorów metoda płytkowa, przydatna przy wychwytywaniu kolonii fosfatazo-

dodatnich w pierwszym wysiewie z badanego materiału (Barber, Kuper 1951), nie znalazła w niniejszej pracy zastosowania ze względu na inny charakter badanego materiału.

Nie zawsze drobnoustroje wytwarzają po 24 godzinach inkubacji wystarczającą ilość fosfatazy dla uwolnienia fenolftaleiny w takiej ilości, by można było uzyskać efekt barwny. Dlatego też w przypadku wyniku ujemnego po 24 godzinach badanie powtarzano po 2 - 7 dniach. Pozwoliło to na wyodrębnienie dwóch grup drobnoustrojów: pierwszej — dającej wynik dodatni po 24 godzinach i drugiej — dającej tzw. odczyn fosfatazowy opóźniony (od 24 godzin wzwyż). Każdorazowo przy badaniu na odczyn fosfatazowy opóźniony pozostawiano jedną probówkę kontrolną (bez wysiewu, kontrola trwałości substratu). Stwierdzono, że odczytywania wyników w przypadku odczynu nastawionego z drobnoustrojami zaliczanymi do grupy pierwszej (należy tu większość szczepów gronkowców i odmieńca) można dokonać już po 13 - 15 godzinach inkubacji. Jeżeli do bulionu z substratem wsiejemy 0,5 ml 6 - godzinnej hodowli bulionowej gronkowców, to wynik odczytać można już po 8 - 10-godzinnej inkubacji.

Dane dotyczące odczynu fosfatazowego u badanych gatunków bakterii przedstawiają się następująco:

1. *Staphylococcus aureus* i *St. albus*. Szczepy gronkowców, w ilości 154, wyizolowano z posiewów nalotów z jamy nosowo-gardzielowej osób chorych lub podejrzanych o błonicę. 137 szczepów uwalniało z Ffs w ciągu 24 godzin inkubacji fenolftaleinę w takiej ilości, że w 118 przypadkach wynik oceniono na +++, w 19 na ++. 60 szczepów gronkowców fosfatazododatnich świeżo wyizolowanych przebadano jednocześnie na wytwarzanie koagulazy, z czego 52 wytwarzały ją. Żaden z 17 szczepów fosfatazoujemnych (po 24-godzinnej inkubacji) koagulazy nie wytwarzał. Przebadanie tych szczepów na odczyn fosfatazowy opóźniony wykazało, że tylko 4 z nich wytwarzają niewielkie ilości enzymu, tak że dopiero piątego dnia można było u 3 szczepów przyjąć wynik za +, a u czwartego za ±. Szczepy gronkowców fosfatazododatnich były w ciągu dwóch lat czterokrotnie sprawdzane na wytwarzanie fosfatazy. Żaden z nich nie utracił zdolności produkowania enzymu ani też zdolność ta nie osłabła w stopniu uchwytnym przy stosowanej metodzie oceny wyników.

2. *Proteus mirabilis* i *P. vulgaris*. Szczepy *Proteus mirabilis* w liczbie 60 i *Proteus vulgaris* w liczbie 11 dawały dodatni odczyn po 24 godzinach inkubacji. Wynik oceniono u 45 szczepów na +++, a u 26 na ++. Wszystkie szczepy odmieńców zachowały zdolność wytwarzania fosfatazy w ciągu dwu lat obserwacji.

3. *Escherichia coli*. Odczyn fosfatazowy u 135 szczepów pałeczki okrężnicy po 24 godzinach inkubacji wypadał ujemnie. 20 szczepów przebadano na odczyn fosfatazowy opóźniony. U 8 z nich ilość wolnej fenolftaleiny wzrastała stopniowo, osiągając 6 dnia poziom oceniany na +, u 7 szczepów zatrzymała się na wartości ±, a u pozostałych 5 wolnej fenolftaleiny nie stwierdzono.

4. *Corynebacterium diphteriae* i *C. hoffmani*. Przebadano 124 szczepy maczugowców błonicy i 12 szczepów maczugowców Hoffmana. Po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji wolnej fenolftaleiny w hodowli nie stwierdzono u żadnego szczepu.

5. *Bacillus subtilis*. Na 11 szczepów laseczki siennej 8 dawało odczyn dodatni po 24 godzinach, oceniany na +++. Pozostałe dawały odczyn opóźniony.

Z przebadanych 26 szczepów laseczek tlenowych, bliżej nie sklasyfikowanych, 12 dawało odczyn dodatni po 24 godzinach, 3 — opóźniony.

6. *Salmonella* i *Shigella*. Przebadano na odczyn fosfatazowy 19 szczepów z rodzaju *Salmonella* i *Shigella*. Po 24 godzinach inkubacji odczyn wypadał u znacznej większości szczepów ujemnie. Odczyn opóźniony wypadał u większości szczepów dodatnio, ale w różnym nasileniu. Wyniki zebrane zostały w tabeli I.

Tabela I

Odczyn fosfatazowy opóźniony

Delayed positive phosphatase reaction

Gatunek Species	Wynik w poszczególnych dniach inkubacji Results of the test after days ... of incubation						
	1	2	3	4	5	6	7
S. typhi 1	−	+	+	++	++	++	++
S. typhi 2	−	+	++	++	++	++	++
S. paratyphi A_1	−	−	−	−	±	±	±
S. paratyphi A_2	−	−	−	−	−	±	±
S. paratyphi A_3	−	−	−	−	−	−	−
S. paratyphi B_1	−	+	++	++	++	++	++
S. paratyphi B_2	−		++	++	++	++	++
S. paratyphi B_3	±	+	++	+++	+++	+++	+++
S. paratyphi C	−	−	−	−	−	+	
S. enteritidis$_1$	−	±	+	++	++	++	++
S. enteritidis$_2$	−	+	++	+++	+++	+++	+++
S. typhimurium$_1$	±	++	+++	+++	+++	+++	+++
S. typhimurium$_2$	−		++	++	++	++	++
S. typhimurium$_3$	−	+	++	++	++	++	++
Sh. shigae$_1$	−	−	−	−	±	±	±
Sh. shigae$_2$	−	−	−	−	−	±	±
Sh. flexneri$_1$	−	±	±	+	++	++	++
Sh. flexneri$_2$	±	+	++	++	++	++	++
Sh. flexneri$_3$	−	−	−	±	+	++	++

WNIOSKI

1. Fosforofenolftaleinian sodu jest wygodnym substratem do badania produkcji fosfatazy przez bakterie. Jest trwały w roztworach wodnych przechowywanych w chłodni. Nie wpływa ujemnie w uchwytny sposób na hodowane w jego obecności drobnoustroje.

2. Spośród wypróbowanych w trakcie pracy podłoży najdogodniejszy okazał się bulion mięsno-peptonowy (zgodnie z obserwacjami Pakuły, Rabczyńskiej i Załęskiej) oraz płyn Tyroda z peptonem.

3. Ilość dodawanego substratu ma wyraźny wpływ na ocenę wyników (Barber, Brooksbank, Kuper), szczególnie przy badaniu szczepów wytwarzających niewielkie ilości enzymu. Optymalnym stężeniem substratu w podłożach płynnych jest 10 mg%.

4. Zdolność wytwarzania fosfatazy przez gronkowce jest cechą trwałą (dwuletnia obserwacja wielokrotnie przesiewanych szczepów) i występującą u świeżo wyizolowanych z materiału zakaźnego szczepów łącznie z wytwarzaniem przez nie koagulazy (Barber 1951, Pakuła 1953). Szczepy koagulazododatnie w miarę powtarzanych przesiewów na podłożach sztucznych tracą zdolność wytwarzania jej. Dlatego też fosfatazo-

dodatniość szczepów nie zawsze może świadczyć o zjadliwości, szczególnie w przypadku, kiedy były przechowywane przez czas dłuższy na podłożach sztucznych i często przesiewane.

5. Jak wykazuje dwuletnia obserwacja 228 szczepów fosfatazododatnich różnych gatunków bakterii, wytwarzanie fosfatazy stanowi cechę stałą niektórych gatunków i może być brane pod uwagę przy diagnostyce biochemicznej.

LITERATURA

1. Barber M., Brooksbank B. W. L. a. Kuper S. W. A., 1951, *J. Path. Bact.*, 63:57.
2. Barber M. a. Kuper S. W. A., 1951, *J. Path. Bact.*, 63:65.
3. Pakuła R., Rabczyńska F. i Załęska H., 1953, *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 5:71.

S. Kałużewski

STUDIES ON THE PHOSPHATASE TEST IN VARIOUS SPECIES OF MICROORGANISMS

Summary

Bacteria were grown in the broth or in Tyrode medium containing peptone and 10 mg% sodium phosphophenolphtaleinate.

Examined 228 strains were divided in two groups: 1) giving positive reaction after 24 hours of incubation, 2) giving positive reaction after 2 - 5 days of incubation (delayed positive reaction). To first group belonged all tested strains of *Proteus vulgaris* and *P. mirabilis*, the majority of strains of *Staphylococcus aureus* and some strains of aerobic bacilli. The second group embraced strains of *Escherichia*, *Salmonella* and *Shigella*.

Bacteria were repeatedly examined during two years. It was shown that the ability for production of a phosphatase is a constant feature of a strain.

According to author's opinion this characteristic can be used for microbiological diagnostic.

The positive phosphatase test is not sufficient measure of the virulence of staphylococci and should be supplemented by coagulase test.

A. Ber i *L. Dryzek*

O CZYNNIKACH WZROSTOWYCH DLA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WYTWARZANYCH PRZEZ *PENICILLIUM*

О РОСТОВЫХ ФАКТОРАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ОБРАЗОВАННЫХ *PENICILLIUM*

Z Zakładu Endokrynologii A. M. w Łodzi

Autorzy przebadali metodą cylinderkową wpływ penicyliny żółtej i białej krystalicznej oraz wyciągów wodnych i chloroformowych z suszonej grzybni pofermentacyjnej *Penicillium chrysogenum Q 176* na wzrost drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Stwierdzono, że penicylina żółta pobudzała wyraźnie wzrost drożdży, przy czym między średnicą strefy pobudzenia a logarytmem użytej dawki penicyliny zachodziła zależność prosta w granicach stężeń od 0,1 do 50 mg ml. Podobne wyniki uzyskano przy użyciu wyciągu wodnego z grzybni w granicach stężeń od 0,1 do 1 mg/ml. Sterylizacja w 130° przez pół godziny nie niszczyła własności wyciągu, choć obniżała jego działanie. Również wyciąg chloroformowy z grzybni i penicyliny żółtej pobudzał wzrost drożdży. Penicylina żółta po ekstrakcji chloroformem nie traciła zdolności pobudzania wzrostu drożdży, ale działała słabiej niż przed ekstrakcją.

Penicylina biała krystaliczna nie wpływała na wzrost drożdży.

Przeprowadzone badania wykazują, że w penicylinie żółtej znajdują się co najmniej dwa czynniki pobudzające wzrost drożdży, z których jeden rozpuszczalny jest w chloroformie, a drugi w wodzie. W grzybni pofermentacyjnej znajdują się przynajmniej trzy czynniki wzrostowe: 1) ciepłostały, 2) ciepłochwiejny rozpuszczalny w wodzie oraz 3) rozpuszczalny w chloroformie.

A. Ber i *J. Zieleniewski*

WPŁYW ANTYBIOTYKÓW NA REGENERACJĘ

I. WPŁYW PENICYLINY BIAŁEJ KRYSTALICZNEJ I DWUHYDROSTREPTOMYCYNY NA REGENERACJĘ KOŃCZYN U ŻAB *XENOPUS LAEVIS* DAUDIN

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ

I. ВЛИЯНИЕ БЕЛОГО КРИСТИЛИЧЕСКОГО ПЕНИЦИЛЛИНА И ДИГИДРОСТРЕПТОМИЦИНА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОНЕЧНОСТЕЙ У ЛЯГУШЕК *XENOPUS LAEVIS* DAUDIN.

Z Zakładu Endokrynologii A. M. w Łodzi

Mimo szerokiego stosowania antybiotyków w leczeniu ran, nie jest dokładnie znane ich działanie na sam proces regeneracji. W związku z tym autorzy przeprowadzili szereg prac na ten temat.

W pierwszym etapie przeprowadzono badania nad wpływem penicyliny białej i dwuhydrostreptomycyny na regenerację kończyn u żab *Xenopus laevis* Daud. Zwierzęta te są dobrymi regeneratorami, a ponadto rana po uciętej kończynie nie podlega uchwytnemu zakażeniu, co pozwoliło na zbadanie działania antybiotyków na sam proces odrastania kończyny.

Badane związki wstrzykiwano żabom do grzbietowego worka limfatycznego co drugi dzień, aż do momentu zakończenia wzrostu regeneratu. Szybkość wzrostu regeneratów badano za pomocą systematycznego mierzenia ich długości.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń ustalono, że hydrostreptomycyna hamuje silnie proces odrastania kończyny, natomiast penicylina biała wywiera również wpływ hamujący, jednakże znacznie słabszy, aniżeli poprzedni związek.

A. Ber i *J. Zieleniewski*

WPŁYW PENICYLINY ŻÓŁTEJ I BIAŁEJ, DWUHYDROSTREPTOMYCYNY I WYCIĄGÓW WODNYCH Z SUSZU GRZYBNI POFERMENTACYJNEJ *PENICILLIUM CHRYSOGENUM Q-176* NA WZROST I ROZWÓJ KIJANEK *XENOPUS LAEVIS* DAUDIN

ВЛИЯНИЕ ЖЕЛТОГО И БЕЛОГО ПЕНИЦИЛЛИНА, ДИГИДРОСТРЕПТОМИЦИНА И ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ СУХОГО ПОСЛЕФЕРМЕНТАЦИОННОГО МИЦЕЛИЯ *PENICILLIUM CHRYSOGENUM Q-176* НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ГОЛОВАСТИКОВ *XENOPUS LAEVIS* DAUDIN

Z Zakładu Endokrynologii A. M. w Łodzi

Szeroko opracowano w piśmiennictwie naukowym wpływ karmienia zwierząt domowych paszą z dodatkiem antybiotyków. Jak wynika z wielu badań poświęconych temu zagadnieniu, zwierzęta takie znacznie szybciej przybierają na wadze aniżeli zwierzęta kontrolne. Mechanizm działania antybiotyków nie jest zupełnie jasny — prawdopodobnie chodzi tu o lepsze wchłanianie składników pokarmowych z jelit. Świadczy o tym mniejsza grubość ściany jelita u zwierząt doświadczalnych.

Niewiele prac poświęcono temu zagadnieniu jeśli chodzi o zwierzęta niższe, w szczególności zmiennocieplne.

Praca niniejsza miała na celu przebadanie wpływu penicyliny białej i żółtej, dwuhydrostreptomycyny oraz wodnych wyciągów z suszu grzybni pofermentacyjnej *Penicillium chrysogenum Q-176* na wzrost i rozwój kijanek *Xenopus laevis* Daudin. Wymienione ciała dodawano do środowiska, w którym przebywały kijanki. W szeregu przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że penicylina żółta i biała nie wywierają wyraźnego wpływu na kijanki, dwuhydrostreptomycyna silnie hamuje ich wzrost i rozwój, natomiast wyciągi wodne z suszu grzybni penicylinowej pofermentacyjnej *Penicillium chrysogenum Q-176* wybitnie przyspieszają wzrost i rozwój kijanek, wpływając również na ich rysunek melanoforowy.

J. Baranowska i *D. Shugar*

ROLA BIAŁEK W METODYCE I W LOKALIZACJI BARWIENIA GRAMEM DROBNOUSTROJÓW

THE SIGNIFICANCE OF PROTEINS IN THE METHODS AND LOCALISATION OF GRAMSTAINING IN MICROORGANISMS

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Praca niniejsza stanowi dalszy ciąg badań nad barwieniem Grama, dotyczący przede wszystkim lokalizacji gramdodatniego zabarwienia. Szczepy, które zwróciły uwagę swoim zachowaniem pod tym względem, są następujące: *Bacillus subtilis 32* (z muzeum PZH) i *Azotobacter chroococcum*. Otoczka badanego szczepu *Azotobacter* wykazuje słabą właściwość barwienia się metodą Grama. Uzyskano zdecydowanie silnie gramdodatnie zabarwienie otoczki za pomocą działania różnych białek w określonych granicach *pH*, różnych dla poszczególnych białek.

Wyniki takie otrzymano zarówno z bakteriami żywymi, jak i zabitymi. W pewnych stadiach rozwoju mikroorganizmów działanie białek w określonych *pH* daje gramdodatnie zabarwienie cytoplazmy.

Wyniki otrzymane przemawiają za tym, że także błona komórkowa bierze udział w tej reakcji. Świadectwem tego są powyższe dane. Kwas nukleinowy w obecności magnezu nie wpływa na właściwości barwienia metodą Grama mikroorganizmów wyżej zacytowanych. Nie wiadomo czy w badanym stadium wzrostu *B. subtilis* występuje otoczka, czy nie. Mikroorganizmy te są gramujemne z wyjątkiem zewnętrznej, ciemniejszej warstwy. Przy działaniu różnych białek błona i otoczka mikroorganizmu uzyskuje wyraźne właściwości gramdodatnie. Wyniki otrzymane ze szczepem *B. subtilis* nasuwają przypuszczenie, że barwienie metodą Grama ogranicza się tylko do błony bakteryjnej, co zostało wykazane mikroskopowo za pomocą barwienia błony.

Z powyższych danych wynika jasno, że barwienie Grama w tym wypadku jest wynikiem połączenia białek i polisacharydów, niezależnie od kwasów nukleinowych.

Wyniki obecne potwierdzają poprzednie przypuszczenie, że rozmieszczenie miejsc barwiących się metodą Grama nie jest jednakowe u wszystkich bakterii i zależy w dużej mierze od czynników zewnętrznych.

Wyniki pracy będą szerzej omówione w oddzielnej publikacji.

A. Jarmolińska i *D. Shugar*

BARWIENIE I DZIAŁANIE RÓŻNYCH ENZYMÓW NA BAKTERIE TERMOFILNE ŻYWE I ZABITE WYSOKĄ TEMPERATURĄ

INFLUENCE OF VARIOUS ENZYMES ON THE THERMOPHILIC BACTERIA, LIVING AND KILLED WITH HIGH TEMPERATURE, AND ON THEIR STAINING

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Badano dwa gramdodatnie i cztery gramujemne szczepy termofilne *Bacillus sp.* o optimum wzrostu w temperaturze 55 - 65°. Szczepy dodatnie wykazują reakcję dodatnią tylko przez pierwsze kilka godzin hodowli; zawieszone w wodzie lub soli fizjologicznej, w temperaturze pokojowej, tracą całkowicie cechę gramdodatniości po okresie około 1 godziny. Przejściowym stadium do całkowitej utraty barwnika jest wyraźne barwienie się charakterystycznych granul wewnątrz komórki, opisywanych przez różnych autorów stosujących odmienne metody barwienia. Komórki gramdodatnie, zabite działaniem wysokiej temperatury, zachowują własności gramdodatnie przez dłuższy czas.

Badane szczepy różnorodnie reagują na działanie lizozymu. Odnośnie szczepów ulegających lizie można ogólnie stwierdzić, iż w procesie lizy biorą również udział autolityczne enzymy komórki. Obserwacje te wskazują, że skład błony komórki termofilnej jest podobny do składu błony mezofilów.

W odróżnieniu od sposobu działania lizozymu na bakterie mezofilne, aktywność lizozymu w stosunku do badanych szczepów termofilnych wykazuje obecność drugiego optimum przy wartości *pH* około 9.

Pepsyna nie działa na szczepy gramujemne, zapobiega natomiast aglomeracji bakterii gramdodatnich w środowisku kwaśnym.

Trypsyna dość gwałtownie wywołuje przejście bakterii gramdodatnich w gramujemne nie działając jednak na wspomniane wyżej granule, które przez dłuższy czas zachowują własności gramdodatnie. Żaden z badanych szczepów nie uległ całkowitej lizie pod wpływem tego enzymu.

Ribonukleaza wykazuje pewne zdolności niszczenia gramdodatnich własności bakterii zabitych wysoką temperaturą, a po 18 godzinach wywołuje częściowe zniszczenie komórek. Badane żywe bakterie termofilne gramujemne ulegają dość szybkiej autolizie już w temperaturze pokojowej, tak że działania na nie niektórych enzymów nie da się uchwycić. Żywe bakterie gramdodatnie nie ulegają podobnej autolizie w tych warunkach.

Ilość kwasu nukleinowego uwolniona z komórek pod wpływem ribonukleazy przy różnych temperaturach tylko nieznacznie różni się od spontanicznego uwalniania się kwasu w tych warunkach.

G. Bagdasarian

METODA BADANIA METABOLIZMU OGÓLNEGO DROBNOUSTROJÓW

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЩЕГО МЕТАБОЛИЗМА МИКРООРГАНИЗМОВ

Z Zakładu Biochemii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Dla celów badania przemiany ogólnej drobnoustrojów wprowadza autor pojęcie oksytropii substratów organicznych i biomasy, wyrażające się ilościowo w postaci liczby elektronowej ε, czyli całkowitej ilości elementarnych ładunków przenoszonych podczas oksydoredukcyjnej mineralizacji substratu, lub liczby tlenowej Ω (synonim — deficyt tlenowy DT) czyli ilości tlenu lub innego akceptora, potrzebnej do wiązania przenoszonych elektronów. W przypadku substratów lub ich mieszanin o znanym składzie wprowadza się następujące wzory, w których pierwiastki oddające elektrony uważane są za dodatnie, zaś przyjmujące elektrony — za ujemne.

$$|\varepsilon| = N_0 \frac{\Sigma n \cdot V}{M} = N_0 \frac{|\Omega|}{8} \text{ elektronów} \qquad (1)$$

$$|\Omega| = 8\Sigma \frac{C}{E} = \frac{\Sigma n \cdot V}{4M} \text{ moli } O_2 \qquad (2)$$

Dla oznaczania oksytropii substratów o nieznanym składzie proponuje się metodę chemiczną, opartą na mineralizacji związków organicznych nadmiarem kwasu jodowego w ściśle kontrolowanych warunkach, z następnym oksydymetrycznym miareczkowaniem niezużytego utleniacza. Przytoczono wyniki zastosowania metody badania oksytropii do zagadnień bakteriologicznych, stwierdzono ich zgodność z teorią, wyliczono błąd prawdopodobny i porównano z innymi metodami. Ustalono związek ilościowy pomiędzy wielkością ε a ilorazem spaleniowym (oddechowym) oraz właściwym ciepłem spalania.

G. Bagdasarian, K. Michalska, A. Odrzywolska i *J. Łyczewska*

BADANIE PODŁÓŻ BAKTERYJNYCH I STANDARYZACJA ZAWIESIN ZA POMOCĄ METODY OKSYTROPII

ИССЛЕДОВАНИЯ БАКТЕРИЙНОЙ СРЕДЫ И НОРМИРОВКА ВЗВЕСЕЙ МЕТОДОМ ОКСИТРОПИИ

Z Zakładu Biochemii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Oznaczanie liczby elektronowej lub tlenowej podłóż, zarówno syntetycznych jak i naturalnych, pozwala na porównywanie między sobą różnych pożywek pod względem zawartości w nich substancji odżywczych, wyrażonych w tych samych jednostkach. Oksytropia różnych pożywek nawet używanych do hodowli tych samych gatunków, wykazuje dużą rozpiętość. Podłoża sporządzone z preparatów handlowych posiadają z reguły niższe ε, niżeli wyliczone teoretycznie.

Liczba tlenowa, wyrażona w mg tlenu na mg suchej wagi waha się w świecie organicznym od 0 do 4, liczba elektronowa od 0 do 3ε, gdzie $\varepsilon = 10^{23}$ elektronów. Dla drobnoustrojów, jak i dla innych komórek, wielkości te posiadają jeszcze bardziej wąskie granice wahań : 1 - 1,7 mg 0 lub 0.75 - 1,2 ε. Liczba elektronowa może być oznaczona dla każdego szczepu, co daje możliwość określania gęstości dowolnej zawiesiny komórek w mg suchej masy na ml. na podstawie nieskomplikowanego miareczkowego oznaczania oksytropii zawiesiny. Uzyskane liczby wykazują dobrą zgodność.

G. Bagdasarian, K. Michalska i *A. Odrzywolska*

BADANIA NAD WSPÓŁCZYNNIKIEM EKONOMICZNYM I SZYBKOŚCIĄ ZUŻYCIA SUBSTRATÓW PRZEZ DROBNOUSTROJE METODĄ OKSYTROPII

ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКОНОМИЧЕСКОГО КОЭФФИЦИЕНТА И СКОРОСТИ РАСХОДА ИСХОДНЫХ ПРОДУКТОВ СРЕДЫ МИКРООРГАНИЗМАМИ МЕТОДОМ ОКСИТРОПИИ

Z Zakładu Biochemii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Współczynnik ekonomiczny drobnoustrojów określa stosunek wytworzonej biomasy M_b do zużytego w tymże czasie substratu S_t:

$$Q = \frac{M_b}{S_0 - S_t} \cdot 100$$

Popełnia się przy tym błąd, polegający: a) na nieuwzględnieniu powstających katabolitów, b) na niewłaściwym wyliczeniu stosunku masy komórek do masy drobnocząsteczkowych substratów w gramach, c) na nieuwzględnieniu mineralnych składników. Metoda ta nie może być stosowana w przypadku kilku substratów lub pożywek o złożonym składzie.

Metoda oznaczania oksytropii eliminuje powyższe źródła błędów. Zastosowana do kilku gatunków grzybów i drobnoustrojów — *Streptomyces griseus, Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum, Mycobacterium tuberculosis* i *M. phlei* — jednocześnie z oznaczeniem Q metodą wagową, wykazała ona wyższość nad poprzednimi metodami, lepszą powtarzalność wyników i większą prostotę wykonania.

Metoda oksytropii pozwala również określić szybkość procesu zużycia substratu. Zasadnicza cecha metody polega w danym przypadku na tym, że substraty i biomasa wyrażane są w tych samych jednostkach (elektronach lub milirównoważnikach tlenu), co umożliwia ich porównanie.

Doświadczenia na tych samych gatunkach drobnoustrojów wykazały zmiany wysokości zużycia, przy czym w drugiej połowie okresu wzrostu następuje zmiana szybkości, odpowiadająca w dalszym okresie reakcji linearnej.

G. Bagdasarian i *A. Odrzywolska*

ZASTOSOWANIE METODY BADANIA OKSYTROPII SUBSTRATÓW BAKTERYJNYCH DLA OBSERWACJI WPŁYWU ANTYBIOTYKÓW

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ ОКСИТРОПИИ БАКТЕРИЙНЫХ ИСХОДНЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ НАБЛЮДЕНИЯ ВЛИЯНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Z Zakładu Biochemii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Usuwając płynne podłoże u powierzchniowo rosnących prątków kwasoopornych, zastępowano je świeżo pożywką, zawierającą streptomycynę i następnie oznaczano ε podłoża w obu przypadkach w różnym czasie i przy różnym stężeniu antybiotyku, wyliczając procent zużycia substratów.

Stwierdzono, że wrażliwy szczep *Mycobacterium 607* praktycznie przestaje zużywać substraty w obecności streptomycyny powyżej 1γ/ml. Tenże szczep został sztucznie zaadaptowany do streptomycyny. Oporna odmiana zużywała nawet w obecności 500 γ/ml streptomycyny takie same ilości substratu jak kontrolne prątki, nie podwarstwione streptomycyną. Sposób ten, przy zastosowaniu metody oznaczania oksytropii substratów do wyhodowanych szczepów, już po trzech dniach wykazuje wpływ antybiotyku na asymilację i różnice w zachowaniu się opornych i wrażliwych odmian.

B. Janota

POWIĄZANIE ANABOLIZMU Z KATABOLIZMEM U *PSEUDOMONAS EXTORQUENS* BASSALIK

ВЗАИМОСВЯЗЬ АНАБОЛИЗМА И КАТАБОЛИЗМА У *PSEUDOMONAS EXTORQUENS* BASSALIK

Z Zakładu Fizjologii Roślin U. W. w Warszawie

Celem niniejszej pracy było kontynuowanie badań nad metabolizmem *Ps. extorquens* rozpoczętych przez K. Bassalika. *Ps. extorquens* jest to pierwszy wyizolowany i zbadany gatunek bakterii posiadający własność korzystania z kwasu szczawiowego jako jedynego źródła węgla.

Przeprowadzone doświadczenia polegały na pomiarach metodą Warburga ilości pochłanianego tlenu i wydzielanego dwutlenku węgla przez bakterie, utleniające kwas szczawiowy lub glikozę. Przeprowadzono również pomiary wymiany gazowej związanej z oddychaniem endogennym bakterii. Celem uzyskania większej ilości danych dotyczących metabolizmu badanych bakterii, starano się, przynajmniej częściowo, wyeliminować z ich metabolizmu procesy syntezy materiałów komórkowych. W tej serii doświadczeń przeprowadzono pomiary ilości pochłanianego tlenu i wydzielanego dwutlenku węgla przez bakterie zatrute azydkiem sodu. Azydek sodu stosowano w stężeniu 1/600, 1/400 i 1/200 M. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wyprowadzono następujące wnioski:

1. Współczynnik oddechowy *Ps. extorquens* na pożywce ze szczawianem wzrasta od 0,28 do 0,61 w ciągu 8 godzin pomiarów, na pożywce z glikozą od 0,58 do 0,73 w ciągu 4 godzin pomiarów.

2. Wymiana gazowa związana z oddychaniem endogennym bakterii zależy od tego, w jakiej pożywce bakterie zostały wyhodowane. Bakterie wyhodowane w pożywce ze szczawianem przez pierwsze dwie godziny pomiarów pobierają dwutlenek węgla, a po czterech godzinach ich współczynnik oddechowy wynosi 0.187. Bakterie wyhodowane w pożywce z glikozą wydzielają od początku pomiarów w wodzie destylowanej dwutlenek węgla, ich współczynnik oddechowy po czterech godzinach wynosi 0,78.

3. Współczynniki oddechowe *Ps. extorquens* związane z utlenianiem wyłącznie szczawianu i z utlenianiem wyłącznie glikozy (uwzględniając oddychanie endogenne) są niższe niż otrzymane z wyliczenia teoretycznego. W przypadku utleniania glikozy różnica ta jest nieduża (po czterech godzinach pomiarów otrzymany współczynnik wynosi 0.73) natomiast w wypadku utleniania szczawianu otrzymany współczynnik (1.01) jest po czterech godzinach czterokrotnie mniejszy niż współczynnik obliczony z równania całkowitego spalenia szczawianu (4,0).

4. Działanie azydku sodu na wymianę gazową *Ps. extorquens* zależy od stężenia azydku, od substratu danego bakteriom w czasie pomiarów i od pożywki, w której bakterie zostały wyhodowane.

5. To samo stężenie azydku silniej hamuje pobieranie tlenu niż wydzielanie dwutlenku węgla, co wpływa na zwiększenie współczynnika oddechowego.

6. *Ps. extorquens* jest zdolna do wiązania nieorganicznego dwutlenku węgla, co wykazano bezpośrednio u bakterii wyhodowanych w pożywce ze szczawianem, a których wymianę gazową badano w wodzie destylowanej.

G. Bagdasarian, D. Hulanicka, H. Kleczkowska, T. Kłopotowski i A. Wiaterowa

BADANIA NAD PRZEMIANĄ MATERII MACZUGOWCÓW BŁONICY. I

STUDIES ON SOME METABOLIC PROCESSES IN *CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE. I*

Z Zakładu Biochemii Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Maczugowce błonicy szczepu *PW 8* hodowano na półsyntetycznym podłożu Mueller-Miller z kwaśnym hydrolizatem kazeiny. Hodowle prowadzono w dwu różnych stężeniach jonu żelazowego. Po upływie różnych okresów, ciała bakteryjne odmywano wirowaniem, zawieszano w soli fizjologicznej, standaryzowano gęstość zawiesiny i badano oddychanie metodą manometryczną w obecności różnych sub-

stratów w moderatorze o *pH* 7,4. Wyniki wyliczano w postaci Q_{O_2} na 1 mg azotu. Zbadano zmiany oddychania w zależności od okresu wzrostu i zawartości żelaza w podłożu. W powyższy sposób zbadano również zdolność utleniania 24 różnych substratów organicznych (cukrów, kwasów tłuszczowych, alkoholi, intermediatów cyklu kwasów trójkarboksylowych i in.) w okresie wzrostu, w którym zaznacza się największe nasilenie oddychania.

Stwierdzono możliwość utleniania przez maczugowce błonicy szeregu substratów — szczególnie dobrze glikozy, kwasu bursztynowego, kwasu mlekowego i innych, oraz brak zdolności do utlenienia wyższych kwasów tłuszczowych.

E. Janczura i *J. Piasecka-Aleksandrowicz*

WYKORZYSTANIE SIARKI I KWASU GLUTAMINOWEGO PRZEZ SZCZEP *PW 8* MACZUGOWCA BŁONICY

THE ASSIMILATION OF SULPHUR AND GLUTAMIC ACID BY *CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE PW 8*

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Siarka jest niezbędnym pierwiastkiem dla wzrostu maczugowca błonicy. W podłożu Muellera i Miller (1941) źródłem siarki jest cystyna dodawana w ilości 20 - 60 mg%, metionina zawarta w hydrolizacie kazeiny w ilości 35 - 100 mg% i siarka nieorganiczna w postaci siarczanu magnezu w ilości 45 mg%.

Z wykonanych porównawczo metodą biologiczną, chemiczną i chromatograficzną oznaczeń wynikało, że po 4 dniach wzrostu drobnoustrojów następował spadek zawartości cystyny przynajmniej do 50%, a często do 1/3 pierwotnej ilości. Przy pierwotnej zawartości cystyny w podłożu sięgającej 60 mg procent jej zużycia był mniejszy. Po 8 dniach wzrostu drobnoustrojów nie stwierdzono dalszego spadku jej zawartości. W hodowlach, gdzie tworzyła się toksyna błonicza, zużycie cystyny było mniejsze niż w podłożu nie zawierającym toksyny. Różnice te jednak nie zawsze były stałe i uchwytne.

Zaobserwowano prawie całkowite zużycie metioniny (70 - 80%) już po 4 dniach wzrostu. Ubytek ilości metioniny w podłożu z toksyną był taki sam jak w podłożu nie zawierającym toksyny.

Ilość siarki nieorganicznej utrzymywała się stale na jednym poziomie.

Już po 24, a częściej po 48 godzinach wzrostu drobnoustrojów wydzielał się siarkowodór. Wywiązywanie się siarkowodoru stopniowo wzrastało i osiągało maksimum w 6 -7 dniu wzrostu. W przeważającej ilości doświadczeń wydzielanie siarkowodoru było mniejsze przy powstawaniu toksyny. Opracowanie tego zagadnienia jest jeszcze w toku.

Zużycie kwasu glutaminowego przez maczugowca błonicy jest bardzo charakterystyczne. Szczególnie wyraźnie można to zjawisko zaobserwować stosując chromatografię bibułową. W podłożu z rozcieńczonym hydrolizatem kazeiny z dodatkiem 400 mg% kwasu dl-glutaminowego widoczny jest spadek zawartości tego kwasu o 30%. Jednocześnie pojawia się duża ilość alaniny (zawartość jej wzrasta z pierwotnej 45 mg% do 100 mg%).

Z podanych wyżej danych widać, że niezależnie od wytwarzania toksyny nie ma wyraźnych różnic w zużyciu kwasu glutaminowego i siarki przy wzroście maczugowca błonicy *PW 8* na podłożu z kwaśnym i enzymatycznym hydrolizatem kazeiny.

O. Sakławska-Szymonowa i *E. Gąsior*

TRANSAMINAZY U *MYCOBACTERII*

ТРАНСАМИНАЗЫ У МИКОБАКТЕРИЙ

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego A. M. w Lublinie

a) Transaminacje u prątków kwasoopornych.

W badaniach swoich oparliśmy się na danych z literatury (Lichstein, Cohen 1945, Gunzalus, Tonzentich 1952, Rudman, Meister 1953, Wiame, Storck 1953, Altenbern, Housewright 1953), dotyczących reakcji transaminacji u różnych drobnoustrojów, a także na pracy Kańskiego, Sa-

kławskiej-Szymona i Szymony (1954), którzy stwierdzili obecność transaminazy asparaginowo-glutaminowej u *Mycobacterium phlei*.

Jakościowe i ilościowe oznaczanie produktów reakcji transaminacji przeprowadzono przy pomocy metody chromatografii bibułowej, a ilościowe oznaczanie aktywności enzymu zawartego w ekstraktach bezkomórkowych, a także w preparatach acetonowych i komórkach różnych szczepów, przeprowadzono metodą manometryczną.

Obecnie prowadzone są badania nad stwierdzeniem wyżej wymienionej transaminazy u innych szczepów prątków kwasoopornych takich jak: *Myc. tuberculosis H 37 Ra, Myc. friburgi* i *Myc. pellegrini* oraz poszukiwanie innych typów transaminazy. Równolegle prowadzone są próby izolacji i bliższej charakterystyki transaminazy asparaginowo-glutaminowej. W wyniku dotychczas przeprowadzonych doświadczeń, stwierdzono obecność transaminazy asparaginowo-glutaminowej u *Myc. tuberculosis H 37 Ra, Myc. friburgi* i *Myc. pellegrini*, oraz transaminazy asparaginowo-pyrogronowej u *Myc. phlei*. Nie udało się natomiast dotychczas wykazać u wyżej wymienionych szczepów reakcji transaminacji między kwasem α-ketoglutarowym lub pyrogronowym a aminokwasami jak: leucyna, izoleucyna, walina, norwalina, izowalina, tryptofan, tyrozyna, fenyloalanina, histydyna i metionina.

Wykazano również, że w preparatach acetonowych *Myc. phlei* i *Myc. tuberculosis H 37 Ra* inkubowanych z dodatkiem asparaginy oraz kwasu α-ketoglutarowego lub pyrogronowego powstaje: kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, α-alanina, kwas γ-aminomasłowy oraz dwa aminokwasy niezidentyfikowane. Obecność kwasu asparaginowego oraz γ-aminomasłowego może przemawiać za działaniem dekarboksylazy kwasu glutaminowego i dezamidazy asparaginy. Ta ostatnia reakcja została stwierdzona przez Rudmana i Meistera w tkankach zwierzęcych (1952).

b) Próby izolowania transaminazy asparaginowo-glutaminowej z *Mycobacterium phlei*.

Jednocześnie przeprowadzono próby nad wyizolowaniem transaminazy asparaginowo-glutaminowej z *Myc. phlei*. Ekstrakcji enzymu dokonywano po uprzedniej dezintegracji komórek bakteryjnych zimnym acetonem, ultradźwiękami oraz rozcierając je mechanicznie z tlenkiem glinu (Al_2O_3). Stwierdzono, że najbardziej aktywne ekstrakty bezkomórkowe otrzymano po dwugodzinnym ucieraniu przemytej masy bakteryjnej albo preparatu acetonowego z Al_2O_3. Dotychczas nie udało się enzymu całkowicie z dezintegrowanych komórek wyekstrahować.

Dalsze badania są w toku.

LITERATURA

1. Altenbern R. A. a. Housewright R. D., *J. Biol. Chem.* 204 : 159.
2. Gunsalus C. F. a. Tonzentich J., 1952: *Nature*, 170 : 162.
3. Kański M., Sakławska-Szymonowa O., Szymona M., 1954: *Acta Biochim. Polon.* 1 : 277.
4. Lichstein H. C. a. Cohen P. P., 1945: *J. Biol. Chem.*, 157 : 85.
5. Rudman D. a. Meister A., 1953: *J. Biol. Chem.*, 200 : 591.
6. Wiame J. M. a. Storck R., 1953: *Biochim. et Biophys. Acta*, 10 : 268.

H. Kurzepa

ACETOBACTER XYLINUM JAKO ILOŚCIOWY WSKAŹNIK KWASU PANTOTENOWEGO

ACETOBACTER XYLINUM В КАЧЕСТВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИНДИКАТОРА ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Opierając się na badaniach Bassalika, z których wynika, że dla wzrostu *Acetobacter xylinum* konieczny jest pantotenian wapnia, przeprowadzono doświadczenia w celu opracowania metody, według której można by oznaczać kwas pantotenowy przy pomocy wymienionego mikroorganizmu.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że przy dodawaniu wzrastających ilości pantotenianu wapnia do pożywki zawierającej 0,1% asparaginy i 3% etanolu otrzymano odpowiednio wzrastające ilości kwasu octowego, przy czym dolna granica ilości pantotenianu wynosi 0,005 γ/ml.

Pożywka zawierająca 5% etanolu nie dawała wyraźnej zależności produkcji kwasu octowego od dawki pantotenianu.

SEKCJA — СЕКЦИЯ — SECTION

II

MIKROBIOLOGIA GLEBY, WODY, POWIETRZA I ŚCIEKÓW

МИКРОБИОЛОГИЯ ПОЧВЫ, ВОДЫ, ВОЗДУХА И СТОЧНЫХ ВОД

MICROBIOLOGY OF SOIL, WATER, AIR AND SEWAGE

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 109—111

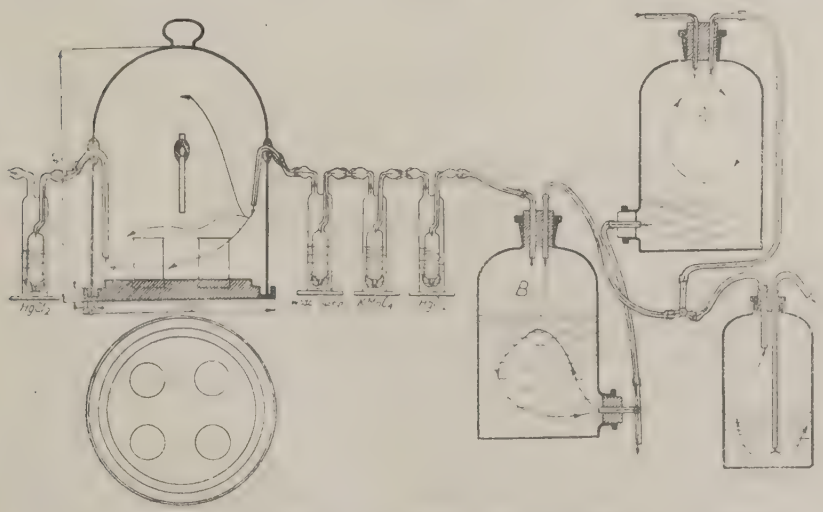
J. Sobieszczański

APARAT DO BADAŃ NAD WPŁYWEM DROBNOUSTROJÓW NA ODŻYWIANIE SIĘ ROŚLIN

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej WSR we Wrocławiu

Do badań nad wpływem drobnoustrojów na odżywianie się roślin konieczna jest aparatura pozwalająca przeprowadzać doświadczenia wegetacyjne w warunkach jałowych.

W Zakładzie Mikrobiologii Rolnej WSR we Wrocławiu skonstruowano i wypróbowano różne aparaty do tego celu. Najodpowiedniejszy z wypróbowanych okazał się aparat skonstruowany według własnych koncepcji w naszym Zakładzie. Schemat tego aparatu przedstawiamy na rysunku 1.

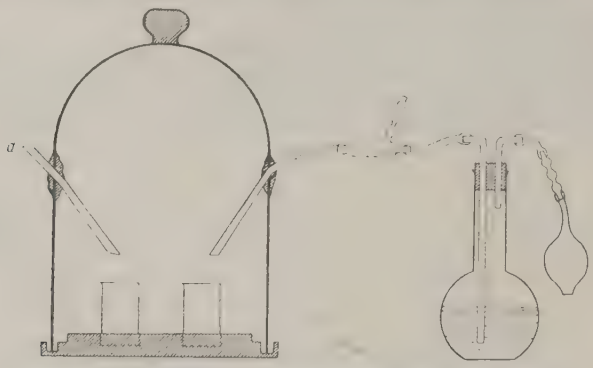


Rys. 1. Aparat do laboratoryjnej hodowli roślin (objaśnienia w tekście)
Рис. 1. Аппарат для стерильного выращивания растений

Aparat ten składa się z okrągłej, aluminiowej podstawy o średnicy 300 mm. Na tej podstawie postawiony jest okrągły, szklany klosz o średnicy 280 mm. wysokości 410 mm. Brzegi tego klosza wchodzą w odpo-

wiednie wgłębienie wytoczone w podstawie. Wgłębienie to wypełnia się olejem parafinowym z 3% dodatkiem kwasu bornego, w celu uszczelnienia klosza. Klosz może być obracany wokół swojej osi.

Na podstawie aluminiowej pod kloszem umieszczone są w naprzeciwległych wgłębieniach (gniazdach) 4 wazoniki. Wykorzystano do tego celu 150 ml zlewki szklane (mogą one być zastąpione wazonikami z glinki kaolinowej). W kloszu na jednej trzeciej jego wysokości zrobiono 4 owalne naprzeciwległe otwory, przez które przeprowadzono szklane rurki, umocowane i uszczelnione kitem azbestowym. Rurki te służą do wysiewu nasion oraz do przewietrzania i podlewania rosnących pod kloszem roślin. Przewietrzanie roślin wykonuje się przez wciskanie pod klosz, przy pomocy słupa wody, określonej objętości jałowego powietrza. W tym celu ustawiono na różnych poziomach 2 dziesięciolitrowe butle szklane z bocznymi tubusami. Po napełnieniu wodą butli *A* otwiera się kurek odprowadzający wodę do butli *B*, niżej stojącej. Wskutek tego powietrze z tej butli wciskane jest przez płuczki z 1% roztworem sublimatu, roztworem



Rys. 2. Urządzenie do jałowego podlewania roślin
Рис. 2. Приспособление для стерильной поливки растений

nadmanganianu potasu i wodą sterylną pod klosz. Na skutek powstającego tam nadciśnienia powietrze spod klosza uchodzi na zewnątrz przez przeciwległą rurkę, połączoną wężykiem gumowym z płuczką napełnioną 1% roztworem sublimatu. Rośliny podlewane są wodą sterylną z kolby połączonej z rurką szklaną przez wycechowany zbiorniczek, dzięki któremu można wprowadzać do wazoników określone ilości wody sterylnej (rys. 2).

Wysiew sterylnych nasion przeprowadza się przez rurkę *d* przy pomocy sterylnego drucika. Kolby z wodą sterylną oraz wysterylizowane płuczki podłącza się z zachowaniem warunków sterylności w szafce Hansena.

Podstawa wraz z kloszem jest sterylizowana, pierwszy raz bez wazoników, w suszarce w temperaturze 150 - 160°, przez 2 gdziny. Potem pod klosz wstawiane są wazoniki napełnione podłożem. Wazoniki te uprzednio są sterylizowane w autoklawie w temperaturze 120°, przez 2 godziny dwukrotnie z przerwą dobową. Cały zestaw z wazonikami jest

jeszcze raz sterylizowany w suszarce przez 2 godziny, w temperaturze 120°.

Sterylizację nasion przeprowadzano w aparaturze i według metody opisanej przez S t o l p a (1952). Po wysterylizowaniu nasion sterylizator umieszcza się w szafce Hansena, otwiera się go i przenosi nasiona przy pomocy drucika na płytki Petriego z pożywką agarową (bulion mięsny, pożywka syntetyczna). Po 24 lub po 48 godzinach nasiona, które zaczęły już kiełkować i wokół których nie ma wzrostu bakteryjnego, wysiewa się opisanym wyżej sposobem do aparatu.

Jako podłoże dawano na wazon: 150 g piasku rzecznego (przemytego i przesianego przez 1 mm sito), 7,5 g roztartego i przesianego kaolinu i odpowiednią ilość pożywki mineralnej według Crone, uzupełnionej mikroelementami i mannitolem.

Doświadczenie wegetacyjne przeprowadzono z gorczycą, gryką, makiem, sałatą, tymotką, jęczmieniem nagim, owsem nagim i prosem. Z braku cieplarni część doświadczenia wegetacyjnego przeprowadzono w pokoju z oświetleniem elektrycznym. W tych warunkach owies, jęczmień, gorczyca i gryka silnie wybiegały. Tymotka i mak rosły słabo, a proso ginęło. Następne doświadczenie, w okresie letnim, przeprowadzono w szklarni, gdzie dobrze rosła gorczyca i przez 3-tygodniowy okres wegetacji zachowana została sterylność podłoża.

Na podstawie dotychczasowych prób wydaje się, że przedstawiony aparat pozwoli na prowadzenie sterylnych kultur niektórych roślin oraz wykorzystanie go w badaniach nad zagadnieniem ich odżywiania.

LITERATURA

1. S t o l p H., 1952; *Arch. Mikrobiol.*, 17: 28.

Ю. Собещански

АППАРАТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УЧАСТИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОРНЕВОМ ПИТАНИИ РАСТЕНИЙ

Резюме

Описана конструкция аппарата для стерильного выращивания растений. Аппарат состоит из алюминиевого основания, стеклянного колпака и приспособления для проветривания растений стерильным воздухом и поливки стерильной водой (Рис. 1 и 2).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 113—115

J. Duda

ZASTOSOWANIE METODY GŁĘBINOWEJ W HODOWLI AZOTOBAKTERA

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej WSR w Poznaniu

Przy hodowli drobnoustrojów tlenowych coraz częściej stosowana jest metoda hodowli głębinowej. Celem metody jest optymalne i równomierne natlenianie podłoża. Metoda posiada dwa warianty. Pierwszy polega na natlenianiu płynnego podłoża drogą stałego doprowadzania do niego pod ciśnieniem jałowego powietrza (metoda fermentorów). Przy wariancie drugim miesza się płynne podłoże z powietrzem przez wprowadzenie w stały ruch kolb z płynną kulturą hodowanych drobnoustrojów. Hodowle głębinowe typu trzęsawkowego mają zastosowanie przede wszystkim w badaniach laboratoryjnych, gdyż pozwalają na uwzględnienie odpowiedniej ilości powtórzeń i kombinacji, co przy metodzie fermentorów przedstawia poważne trudności techniczne.

Wartość stosowania metody hodowli głębinowej polega głównie na skróceniu czasu hodowli. Tą drogą R a u c h i P e i k e r (1950) skrócili czas trwania hodowli *Phycomyces blakesleanus* (mikroorganizm testowy do oznaczania tiaminy) z 10 do 4 dni.

W pracy niniejszej zastosowano metodę głębinową w hodowli azotobaktera. W celu ujęcia różnic między hodowlą głębinową a hodowlą statyczną (hodowla w zwykłym termostacie) oznaczano w określonych terminach trwania hodowli przyrost ilości komórek, suchej masy bakterii, procent zużycia cukru oraz ilość związanego azotu.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Hodowlę azotobaktera prowadzono na pożywce z wodą wodociągową o składzie: glikoza — 2%, K_2HPO_4 — 0.1%, $MgSO_4$ — 0,05%, NaCl — 0,05%, $CaCO_3$ — 0,2%, $Fe_2(SO_4)_3$ — 0,002%, Na_2MoO_4 — 0,005%.

Do doświadczeń użyto czyste kultury dwóch szczepów azotobaktera wyizolowanych z dwóch różnych typów gleby. Szczep 1 uzyskano z gleby lessowej, szczep 2 z gleby szczerkowej. Hodowlę prowadzono w 50 ml pożywki w kolbach o pojemności 300 ml. Powyższa proporcja nie stwarzała niebezpieczeństwa zwilżania korków pożywką. Długość przesuwu w termostacie trzęsawkowym ustalono na 8 cm, a ich częstotliwość 1 sek. Hodowlę prowadzono przy temperaturze 27°. Kolby szczepiono dwudniową płynną kulturą azotobaktera.

W terminie 24, 48, 72, 96, 120 i 168 godzin po założeniu doświadczenia zdejmowano po 3 kolby każdej kombinacji i oznaczano ilość komórek azotobaktera, suchą masę bakterii, ilość cukru oraz ilość azotu ogólnego.

Ilość komórek azotobaktera liczono w komorze Thoma. Cukier oznaczano zmodyfikowaną metodą Schoorla (Allgem. Untersuchungsmeth. 1935).

Azot ogólny oznaczano metodą Kjeldahla.

Wyniki analiz przedstawiono w tabeli.

Tabela I

Rozwój kultury azotobaktera w warunkach hodowli statycznej i głębinowej
Growth of *Azotobacter* in stationary and submerged cultures.

Szczep Strain	Analiza po godzinach Analysis after hours ...	Kultura statyczna Stationary culture				Kultura głębinowa Submerged culture			
		Ilość komórek w 1 ml pożywki w mln Number of cells per 1 ml of culture medium (in millions)	Sucha masa bakterii w 1 ml pożywki w mg Dry weight of bacteria per 1 ml of culture fluid in mg	Zużycie glikozy w % Amount of glucose consumed (per cent)	Związany N w mg na 50 ml pożywki Amount of N_2 fixed in mg per 50 ml of culture fluid	Ilość komórek w 1 ml pożywki w mln Number of cells per 1 ml of culture fluid (in millions)	Sucha masa bakterii w 1 ml pożywki w mg Dry weight of bacteria (in mg) per 1 ml of culture fluid	Zużycie glikozy w % Amount of glucose consumed (per cent)	Związany N w mg na 50 ml pożywki Amount of N_2 fixed in mg per 50 ml of culture fluid
1	0	0,007	—	—	—	0,007	—	—	—
	24	3,1	—	3,0	0,37	11,750	—	8,5	1,94
	48	46,0	0,26	15,2	2,62	810,0	5,80	64,1	8,14
	72	78,0	0,46	26,8	4,22	860,0	5,90	98,1	12,05
	96	152,5	0,99	51,5	7,65	—	5,80	100,0	12,80
	120	280,0	1,81	83,1	11,84	—	—	—	—
	168	580,0	4,02	94,6	16,72	—	—	—	—
2	0	0,006	—	—	—	0,006	—	—	—
	24	3,25	—	2,9	0,51	8,95	—	7,1	1,55
	48	37,00	0,19	10,0	2,48	604,00	4,90	48,0	6,18
	72	120,00	0,58	39,0	3,94	825,00	5,40	93,7	8,88
	96	283,00	1,24	63,0	6,06	—	5,50	97,0	9,50
	120	524,00	2,60	73,5	9,12	—	—	—	—
	168	748,00	3 52	87,2	11,56	—	—	—	—

Po 72 godzinach hodowli głębinowej liczenie komórek w komorze Thoma było już niemożliwe z powodu szybko postępującego w ciągu czwartego dnia starzenia się kultury. Wyrażało się ono szybkim brunatnieniem podłoża i zgruźlaniem komórek. Na ukończenie rozwoju kultury w ciągu pierwszych trzech dni wskazuje również brak przyrostu suchej masy bakterii oraz prawie całkowite wyczerpanie cukru z podłoża.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Wyniki doświadczenia wskazują, że stosunkowo wolny rozwój azotobaktera w kulturach statycznych tłumaczyć należy niedostatecznymi i pogarszającymi się w miarę trwania kultury warunkami tlenowymi. Zwiększenie natlenienia podłoża przez mieszanie go z powietrzem przyśpiesza mnożenie się komórek, a tym samym skraca znacznie fazę mnożenia. W przytoczonym doświadczeniu faza ta kończy się już po trzech dniach, podczas gdy krzywa fazy mnożenia się komórek w kulturach

statycznych nie osiąga jeszcze swego maksimum po 7 dniach. Interesujące jest to, że w warunkach hodowli głębinowej uzyskano przy hodowli obu szczepów nieco niższą wartość związanego azotu. Przyczyn tego zjawiska nie wyjaśniono.

Zastosowanie hodowli głębinowej mogłoby mieć znaczenie przy produkcji szczepionek azotobakterowych dla potrzeb rolnictwa oraz ewentualnym wykorzystaniu azotobaktera do produkcyjnego wiązania azotu cząsteczkowego.

W badaniach laboratoryjnych hodowla głębinowa azotobaktera oddać może usługi ze względu na skrócenie czasu hodowli oraz duży stopień zgodności powtórzeń. Wartość metody w porównaniu z metodą statyczną wyraża się i w tym, że w hodowli głębinowej nie zachodzi zjawisko różnicowania się kultury przez wytwarzanie starzejących się kożuszków opadających na dno. Zjawisko to, charakterystyczne dla hodowli tlenowców na podłożu płynnym, w poważnym stopniu utrudnia badania ich metabolizmu, gdyż może powodować wtórne zmiany w podłożu, pochodzące z autolizy i obumierania osadów bakteryjnych.

LITERATURA

1. Allgemeine Untersuchungsmethoden, II Teil, Berlin 1935.
2. Rauch J., Peiker J., 1950: Eine Methode zur Vitamin B_1-Bestimmung mittels des *Phycomyces*-Test in der Submerskultur., *Biochem. Z.*, **321**:

J. Duda

THE APPLICATION OF SUBMERGED CULTURES FOR GROWING *OF AZOTOBACTER*

Summary

Azotobacter was grown in normal liquid cultures and in submerged cultures aerated by shaking in specially constructed thermostat.

The number of bacteria was estimated by direct microscopic count in the Thomachamber and by dry mass determination. The growth was also evaluated on the basis of the amount of sugar utilized and nitrogen fixed.

It was shown that the growth rate of *Azotobacter* in submerged culture is much greater than in commonly used stationary cultures. In normal stationary liquid cultures the full growth was reached in seven days and in submerged cultures in three days.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 117—119

T. Wróbel

A SEARCH OF A RAPID METHOD FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF STRAINS OF THE ROOT-NODULE BACTERIA

From the Department of Soil Microbiology I.U.N.G. in Puławy

The activity of *Rhizobium* strains, or their ability of nitrogen fixation in symbiosis with leguminous plants is usually estimated on the basis of the yield of the inoculated plants and of their nitrogen content. This way of measuring that activity is very succesful, but it requires a long period of time.

The nodule bacteria used in the production of cultures for legume inoculation may loose their activity during their storage. It is therefore desirable to examine the strains in respect of their ability of nitrogen fixation more frequently, which requires more rapid methods of testing.

There are different methods of determining the activity of *Rhizobium* strains.

Helcer a. Jatwiejewa (1948) report, that in order to test the activity of strains of the root-nodule bacteria, attention must be paid to:

a) the kind of nodulation (shape, size, distribution and number of nodules),

b) the amount of red pigment (haemoglobine) in the nodules,

c) the longevity of the nodules,

d) the nitrogen content in nodules.

Chemical methods have been applied too in pure cultures of *Rhizobia* (Mazé, Fred et al 1932. Fiedorow 1948, 1952, Rabotnowa 1951, Fiedorow, Uspienskaja 1955). The quantity of the nitrogen fixed by these bacteria in liquid cultures has been considered as an indicator of the effectiveness of a given *Rhizobium* strain.

According to Fred and Baldwin (1932) during the development of nodule bacteria in liquid media a marked decrease of the redox potential is to be noted. Rabotnowa (1951) tried to apply the redox test for determining the activity of *Rhizobia*. Kłosowska (1952) studied the redox potential in the tissues of root-nodules. She has stated that redox potential is especially low in juices of the inoculated plants before the begining of their blooming.

Virtanen (1947) and Jordan and Garrard (1951) have found, that there exists a close correlation between the haemoglobin content in the nodules and the quantity of nitrogen fixed by nodule bacteria. They worked out a method of measuring this pigment and applied it to determine the effectiveness of *Rhizobium* strains.

Kobus (1952) and other authors have studied the morphological and physiological properties of more or less active and inactive *Rhizobium* strains. They did not find however any relation between these properties and the degrees of activity of the strains studied.

The aim of our present work is to determine the activity of various strains of nodule bacteria during the early stage of plant growth, i. e. in the begining of symbiosis of these bacteria with their host plants.

For this purpose pot experiments were carried out with 7 strains of *Rhizobium leguminosarum* and 9 strains of *Rh. lupini* derived from *Ornithopus*.

Pisum and *Ornithopus* were inoculated with corresponding strains of *Rhizobium*. In 16 series of pot cultures the following analyses and observations have been carried out at different age stages of the plants:

1) evaluation of the distribution, number, size, shape, colour and weight of root nodules,

2) the acidity of root juices,

3) oxidation-reduction potential of the root juices,

4) yields of the plants,

5) nitrogen content in the yields of plants and in the root nodules.

The yield of mature plants and their nitrogen content were considered here as established indicators of the effectiveness of *Rhizobium* strains.

In his experiments the author has compared the values of plant analyses obtained with the classical methods (yields and N estimation) with the values obtained with other methods used.

His main conclusions are:

1) The number, size, shape, weight and colour of the nodules ought not to be generally accepted as an indicator of the bacterial activity.

2) *pH* values of the root juices of uninoculated peas and *Ornithopus* were higher than these of the inoculated plants. During the whole period of growth of these plants a distinct difference could be noted in the *pH* value of the plants inoculated with various strains.

3) The root juices of peas and *Ornithopus* inoculated with effective strains had a lower Redox potential than the juices of plants inoculated with less active strains.

The author considers therefore the *pH* and redox potential determinations in the inoculated plants as a promising means of evaluation of the activity of *Rhizobium* strains. Further investigations are still needed.

LITERATURE

1. Allen W. P., Baldwin L., 1932. Oxidation-reduction potential in relation to growth of aerobic form of bacteria, *J. Bact.*, **23**: 369.
2. Fiedorow M. W., 1948: Fiksacija azota atmosfiery czistymi kulturami *Bact. radicicola*. Puti powyszenija aktiwnosti kłubieńkowych baktierij. Moskwa.
3. Fiedorow M. W., 1952: Biołogiczeskaja fiksacija azota atmosfiery. Moskwa.
4. Fiedorow M. W. i Uspienskaja, 1955: Fiksacija azota atmosfiery czistymi kulturami kłubieńkowych baktierij gorocha, soi i klewiera. *Dokł. Akad. Nauk SSSR*: 177.
5. Fred E. B., Baldwin J., Mc Coy E., 1932, Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison.

6. Holcer F. J., Jatwiejewa A. W., 1948: Łaboratornyj mietod opriedielenija aktiwnosti kłubieńkowych baktierij. Puti powyszenija aktiwnosti kłubieńkowych baktierij. Moskwa.
7. Jordan D. C. a. Garrard E. H., 1951: Studies on the legume root nodule bacteria of effective and ineffective strains. *J. Canad, Sci.*, 4 : 350.
8. Kłosowska T., 1952: Rozwój symbiozy *Rhizobium leguminosarum* z grochem. (Praca magisterska, nieopublikowana). Puławy.
9. Kobus J., 1952: Niektóre cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii symbiotycznych roślin motylkowych. *Acta Microbiol. Polon.*, 2 : 137.
10. Rabotnowa I. Ł., 1951: Okislitielno-wosstanowitielnyj potiencjał sriedy w swiazi s uswojenijem molekularnogo azota. *Mikrobiołogija*, 5 : 526.
11. Virtanen I., 1947: On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules, p. I, *Acta Chim. Scand.*, 1 : 90.
12. Virtanen I., Erkoma J., Linkola H., 1947. On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules p. II. *Acta Chim. Scand.*, 1 : 861.

T. Wróbel

POSZUKIWANIE SZYBKICH METOD OKREŚLANIA AKTYWNOŚCI SZCZEPIONEK BAKTERYJNYCH DLA ROŚLIN MOTYLKOWYCH

Streszczenie

Szczepy macierzyste używane do produkcji szczepionek dla roślin motylkowych oraz szczepionki stosowane w praktyce mogą w czasie przechowywania ich zmniejszać swoją aktywność. Dlatego też pożądane jest częste sprawdzanie ich zdolności wiązania azotu w symbiozie z odpowiednią rośliną motylkową. Jedynym stosowanym dotychczas sposobem określania tej aktywności jest oznaczanie wielkości plonu i zawartości w nim azotu. Takie oznaczenia wymagają jednak długiego czasu.

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie, w jakim stopniu takie właściwości, jak charakter brodawkowania, morfologia bakteroidów, zawartość hemoglobiny i azotu w brodawkach korzeniowych, zawartość azotu w sianie, oraz wielkość *pH* i potencjału oksydo-redukcyjnego w soku korzeniowym w różnych okresach wegetacji roślin mogą być wskaźnikiem aktywności szczepów *Rhizobium*.

Z dotychczasowych obserwacji wynika, że charakteru brodawkowania (ilość, wielkość, rozmieszczenie, ciężar i barwa brodawek) nie można przyjąć za ogólne kryterium przy określaniu aktywności szczepów. Natomiast istnieje dość wyraźna zależność wysokości potencjału oksydo-redukcyjnego soku korzeniowego od aktywności *Rhizobium*. Mianowicie sok korzeniowy grochu szczepionego szczepami aktywnymi miał przez cały okres wegetacyjny niższy potencjał Redox niż u roślin szczepionych szczepami mniej aktywnymi.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 121—123

Т. Врубель, Ю. Голембёвска

ИНОКУЛЯЦИЯ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ НА РАЗЛИЧНЫХ ПОЧВАХ

Из лаборатории почвенной микробиологии Института обработки и удобрения почвы (I.U.N.G.) в Пулавах

Вегетационные опыты, проводимые в сосудах в течение двух лет, посвящены проблемме влияния инокуляции на бобовые растения. Поставлена при этом задача определения зависимости характера клубенькования от типа почвы, а также от качества введеных при инокуляции клубеньковых бактерий.

В исследованиях применены следующие почвы: 1) лёгкая супесь, 2) кислая лёгкая супесь, 3) супесь на песчанике, 4) песчаная почва, 5) подзолистый суглинок, 6) аллювиальная почва, 7) лёсс, 8) чернозём.

На вышеуказанных почвах проведены исследования с люпином, сараделлой, люцерной и горохом в двух сериях: контрольной и с инокуляцией соответствующим видом *Rhizobium*.

Во время вегетации велись наблюдения над развитием растений и их клубенькованием. В конце исследований определено воздушно-сухой вес надземной массы растений и содержание в них азота.

На основании полученных результатов (Таб. 1 и 2) сделаны следующие выводы:

1. В течение 2 лет на всех почвах наиболее сильно и всегда положительно реагировала на инокуляцию люцерна. Увеличение урожая и содержание азота отмечено особенно на более легких почвах и на лёссе.

2. Повышение урожая гороха обнаружено тоже на более легких почвах (песок, супесь, подзолистый суглинок). Не замечено увеличения урожая на аллювиальной почве, лёссе и чернозёме. Растения реагировали на инокуляцию сильнее всего на супеси. На этой почве увеличение урожая достигало 50% по сравнению с контрольной. Самое большое повышение содержания азота найдено тоже на более легких почвах.

3. Люпин реагировал на инокуляцию в большинстве случаев положительно, увеличивая урожай до 40%. Содержание азота в сене люпина было одинаково так в контрольной, как и в опытной серии.

4. При сараделле отмечено самое значительное увеличение урожая на аллювиальной почве (49%). Содержание азота в инокулированных растениях было при этом в 2-раза больше чем в контрольной культуре. Обнаружено положительное влияние инокуляции на

Таблица 1

Влияние инокуляции бобовых растений на различных почвах 1952 г.
Szczepienie roślin motylkowych na różnych glebach

Почва Gleba	Люпин Łubin				Горох Groch				Люцерна (из 4 покосов). Lucerna (suma z 4-ch pokosów)			
	урожай в. с. надземной массы в г. plon p.s.m. pędów w g		прибавка % % przyrost w % %		урожай в. с. надземной массы в г. plon p.s.m. pędów w g		прибавка % % przyrost w % %		урожай в. с. надземной массы в г. plon p.s.m. pędów w g		прибавка % % przyrost w % %	
	контр. kontr.	инокул. szczep.	урож. plonu	азота azotu	контр. kontr.	инокул. szczep.	урож. plonu	азота azotu	контр. kontr.	инокул. szczep.	урож. plonu	азота azotu
Супесь Piasek gliniasty	16.34	18.32	+ 12	+ 8	1.80	2.72	+ 51	+ 90	13.28	22.42	+ 69	—
Лёгкая супесь Szczerk lekki	20.28	20.42	0	+ 6	4.57	3.98	— 13	— 43	34.86	35.70	+ 5	—
Подзолистый суглинок Bielica	16.98	18.12	+ 6	+ 8	2.62	2.67	+ 2	+ 10	22.49	31.86	+ 41	—
Аллювиальная почва Mada	10.24	14.51	+ 41	+ 44	4.40	3.40	— 23	+ 2	32.16	37.00	+ 18	—
Лёсс Less	18.40	20.46	+ 11	+ 14	3.92	3.87	0	+ 26	24.08	30.92	+ 28	—
Чернозём Czarnoziem	15.44	16.94	+ 10	+ 12	2.17	2.17	0	— 2	21.86	23.10	+ 5	—

Таблица 2

Влияние инокуляции бобовых растений на различных почвах в 1953 г.
Szczepienie roślin motylkowych na różnych glebach

Почва Gleba	Люпин Łubin				Горох Groch				Люцерна (из 2 покосов) Lucerna (suma 2 pokos.)				Сераделла Seradela			
	урожай в. с. надземной массы в г. plon p.s.m. pędów w g		прибавка % % przyrost w % %		урожай в. с. надземной массы в г plon p.s.m. pędów w g		прибавка % % przyrost w % %		урожай в. с. надземной массы в г. plon p.s.m. pędów w g		прибавка % % przyrost w % %		урожай в. с надземной массы в г plon p.s.m. pędów w g		прибавка % % przyrost w % %	
	контр. kontr.	инокул. szczep.	урожая plonu	азота azotu	контр. kontr.	инокул. szczep.	урожая plonu	азота azotu	контр. kontr.	инокул. szczep.	урожая plonu	азота azotu	контр. kontr.	инокул. szczep.	урожая plonu	азота azotu
Песчаная почва Gleba piaszczysta	17.76	18.78	+6	+2	14.61	15.09	+3		9.84	14.47	+47	+121	12.38	12.03	3	18
Кислая лёгкая супесь Szczerk kwaśny	17.88	18.76	+5	+10	10.41	11.77	+13	+27	19.01	25.20	+33	+51	13.28	13.78	+3	+4
Подзолистый суглинок Bielica	13.87	15.87	+14	+6	11.29	12.96	+15	+25	18.74	19.38	+3	+22	14.66	14.76	+6	+106
Аллювиальная почва Mada	13.91	15.98	+15	+7					5.88	7.46	+27	+32	6.18	9.18	+49	+210
Лёсс Less	12.72	12.66	0	−1	14.36	14.16	0	−3	3.66	8.17	+123	+141	11.79	10.88	−8	−9

растения на кислых почвах (после предварительного их известкования).

В течение вегетационного периода велись наблюдения над еразованием клубеньков. Обнаружено, что размеры, форма и разобщение клубеньков зависят от почвы в большей степени, чем от эффметивности штаммов клубеньковых бактерий. Особенно сильно это проявилось у гороха и сараделлы, которые на различных почвах имели разный характер размещения, окраски, формы и размеры корневых клубеньков.

В случаях, когда инокуляция влияла на урожай растений положительно, клубеньки имели более интенсивную розовую окраску и иногда были по размерам больше, чем в контрольной культуре, где заражение наступало местными бактериями.

T. Wróbel i *J. Gołębiowska*

SZCZEPIENIE BAKTERIAMI BRODAWKOWYMI ROŚLIN MOTYLKOWYCH NA RÓŻNYCH TYPACH GLEB

Streszczenie

Celem doświadczeń wazonowych prowadzonych przez dwa lata było stwierdzenie, w jakim stopniu reagują u nas rośliny motylkowe na szczepienie bakteriami brodawkowymi w zależności od typu gleby. Zbadano też, w jaki sposób szczepienie to wpływa na brodawkowanie roślin, starając się określić czy charakter brodawkowania bardziej zależy od typu gleby, czy też od właściwości wprowadzonej szczepionki.

Na podstawie otrzymanych wyników (tabela 1 i 2) można było stwierdzić, że w naszych warunkach na różnych typach gleb najsilniej reaguje na szczepienie lucerna. Przyrost jej plonu wahał się w naszych doświadczeniach w granicach od 3 do 120%. Łubin reagował również w większości wypadków dodatnio na szczepienie. Groch dawał na ogół około 15% przyrostu plonu na glebach lekkich (piasek, szczerk, bielica), na piasku gliniastym przyrost był znacznie większy i wynosił 50%. U seradeli największy przyrost plonu otrzymano na madzie.

Reasumując, wpływ szczepienia najwyraźniej zaznaczał się na glebach kwaśnych (po uprzednim ich zwapnowaniu).

Obserwacje nad brodawkowaniem roślin prowadzono w ciągu całego okresu wegetacji. Wykazały one, że wielkość, kształt i rozmieszczenie brodawek na korzeniach mogą zależeć bardziej od typu gleby niż od właściwości wprowadzonej szczepionki.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 125—127

J. Gołębiowska

A METHOD OF INVESTIGATION OF THE MICROBIAL POPULATION PLAYING A PART IN THE TRANSFORMATION OF PHOSPHORUS COMPOUNDS IN THE SOIL

From the Department of Soil Microbiology, IUNG, Puławy

Phosphorus compounds existing in the soil or introduced into it with fertilizers undergo in this environment different transformations.

The microorganisms play in these processes a great part. They solubilise and assimilate phosphates and decompose the organic compounds of phosphorus.

The assimilation of available inorganic phosphorus by the microorganisms may be considered as a proces infavorable for good plant development. It is known however, that microorganisms can assimilate phosphorus not only from the compounds available for the plants, but also from the insoluble phosphates as well as from their organic and inorganic complexes. The resulting from this assimilation microbial nucleoproteids can afterwards easily undergo decomposition. In this case the assimilation of phosphorus by microorganisms may be considered as a useful process, as it can contribute to a constant and equal supply of phosphorus to the plants. Moreover some species or strains of microorganisms can directly dissolve insoluble phosphates.

In our work we tried to find out and differentiate among the soil microbial population microorganisms active in different transformations of phosphorus compounds.

The method used by us is based upon the qualitative-quantitative method, which L o c h h e a d applied for dividing bacteria in soil population into morphological and nutritional groups (L o c h h e a d a. T a y l o r 1938, T a y l o r a. L o c h h e a d 1938, L o c h h e a d a. C h a s e 1943). In this way he distinguished groups of microorganisms sensitive to different amino-acids and growth factors. This method has been modified and adapted to determine the groups of microorganisms specifically responding to different phosphorus sources.

D e s c r i p t i o n o f t h e m e t h o d. The commonly employed plate culture on a medium used for determining the total number of bacteria and actinomycetes is used here. The plates are incubated at 28° during 5 - 10 days. The colonies, which developed on each plate after this time, are counted and from the whole surface of a plate or from its sector 25 colonies are picked off and cultivated as stab cultures in semisolid agar with the following composition of nutrients:

Soil extract — 100 ml; yeast extract — 100 ml; K_2HPO_4 — 0,2 g; agar — 3 g; tap water — 800 ml; *pH* about 7.

Lochhead reports, that 92 per cent of his cultures grow well when transferred on such a medium from the colonies developing on the plates. Our experiments also confirmed these observations.

It is therefore assumed, that the raw cultures obtained in this manner can represent a microbial population characteristic for a given soil.

All the strains are afterwards reinoculated into liquid synthetic media which contain different phosphorus compounds. We used for our experiments: easily available K_2HPO_4, insoluble $Ca_3(PO_4)_2$, and glicerophosphate as an organic phosphorus compound.

The composition of our synthetic liquid medium is as follows: mannitol — 10 g; asparagine — 0,5 g; $MgSO_4$ — 0,2 g; $CaCl_2$ — 0,1 g; biotin — 0,5 mmg; water — 1000 ml; *pH* about 7.

Phosphorus was added to the medium in all the mentioned above compounds as about 400 mg P_2O_5 per 100 ml. Moreover a control medium was prepared without phosphorus. After 4 - 5 days of incubation at 28° the intensity of the turbidity of cultures with different phosphorus sources was determined by four degrees. The difference of two degrees in the growth intensity was considered to be essential.

This way of proceeding allowed us to divide the microbial population into following groups:

1) microorganisms utilizing at the same rate inorganic and organic phosphorus compounds,

2) microorganisms utilizing inorganic phosphorus better then the organic one,

3) microorganisms utilizing better the organic phosphorus.

We have tried also to find out these cultures, which do not only assimilate phosphorus from its organic compounds, but are as well capable of breaking down glicerophosphate. For this analysis we have used a colorimetric method in order to determine the formation of soluble phosphates in the cultures containing glicerophosphate.

The strains, which were able to dissolve $Ca_3(PO_4)_2$, were determined on agar plates containing a modified medium of Pikowska (1948) and composed of: $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 g; glucose — 20 g; $Ca_3(PO_4)_2$ — 5,0 g; NaCl — 0,2 g; $MgSO_4$ — 0,1 g; $MnSO_4$ and $FeSO_4$ — traces; agar — 20 g; tap water — 1000 ml; *pH* about 7.

In these conditions of culture around the growth of active strains solubilization zones could easily be detected as a result of calcium phosphate breakdown.

In this way besides the groups mentioned above we could distinguish also the following groups:

4) microorganisms transforming phosphorus from organic phosphorus into soluble phosphates,

5) microorganisms dissolving $Ca_3(PO_4)_2$.

The whole microbial population may belong to the first three groups given above. Microorganisms described as belonging to the last two groups can be at the same time components of the three former ones. Nevertheless the distinguishing of the last two groups allows a more exact knowledge of the capacity of microorganisms to transform phosphorus in soil and in the rhizosphere of plants.

LITERATURE

1. Lochhead A. G., Taylor C. B., 1938: Qualitative studies of soil microorganisms I. General introduction. *Canad. J. Research*, **16 C**: 152.
2. Taylor C. B., Lochhead A. G., 1938: Qualitative studies of soil microorganisms II. A survey of the bacterial flora of soil differing in fertility. *Canad. J. Research*, **16 C** : 162.
3. Lochhead A. G., Chase F. E., 1943: Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. *Soil Sci.*, **55**:185.
4. Pikowskaja R. I., 1948: Mobilizacija fosfatow w poczwie w swiazi s żiznie-diejatielnostju niekotorych widow mikrobow. *Mikrobiołogija*, **17**:362.

J. Gołębiowska

METODA BADANIA ZESPOŁÓW MIKROFLORY GLEBOWEJ CZYNNEJ PRZY PRZEMIANACH ZWIĄZKÓW FOSFOROWYCH W GLEBIE

Streszczenie

Celem pracy było określenie w zespole mikroflory glebowej grup drobnoustrojów atakujących różnorodne mineralne i organiczne związki fosforu.

Wzorując się na jakościowo-ilościowej metodzie Lochheada, stosowanej przez tego autora do określania składu procentowego różnych morfologicznych i fizjologicznych grup drobnoustrojów glebowych w zespole mikroflory glebowej, opracowano sposób zróżnicowania takiego zespołu pod względem ustosunkowania się poszczególnych jego komponentów do różnych związków fosforowych.

Wyróżniono następujące grupy drobnoustrojów:

1) wykorzystujące równie dobrze fosfor ze związków mineralnych jak i organicznych,
2) wykorzystujące lepiej fosfor mineralny,
3) wykorzystujące lepiej fosfor organiczny,
4) mineralizujące glicerofosfat,
5) rozpuszczające trójzasadowy fosforan wapnia.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 129—132

A. Nowotny-Mieczyńska and *J. Gołębiowska*

THE INFLUENCE OF MICROBIAL POPULATION ON THE PHOSPHORUS UPTAKE BY SOME CROP PLANTS

From the Department of Soil Microbiology, IUNG, Puławy

The main purpose of the present research was to obtain some informations concerning the ability of soil microorganisms to influence phosphorus uptake by some crop-plants.

In our preliminary studies an attempt has been made to determine the dependence of microbial population, which takes part in different phosphorus transformations, on such factors as: type of soil, plant species and stage of plant growth. The influence of rhizosphere is also studied here, in samples of the soil from the rhizosphere and apart from the roots.

Microbial and chemical analyses have been made at different stages of plant growth in pot experiments, which have been carried out during two years.

Organic and mineral phosphorus has been determined in the plants and in soil samples taken from the rhizosphere, or from the soil, which had no contact with the roots. Groups of microorganisms specifically responding to different phosphorus sources have been determined too. The method of determining these groups of microorganisms is given in the previous report on the page 125.

The results of our experiments indicate, that independently of the kind of soil and of its origin, the microorganisms able to make use of both inorganic and organic phosphorus compounds were the most abundant and the microorganisms having more specific phosphorus nutrient requirements were less numerous.

Figures 1, 2 and 3 show the relationships of some microbial populations in three different types of soil, in the rhizosphere of three species of plants, and in the soil samples from the rhizosphere or taken away from the roots.

In studying the microbial populations of different types of soil (fig. 1) it seems, that microorganisms utilizing better organic than mineral phosphorus compounds were more numerous in loess and in sandy-soil than in pure sand. Nevertheless loess was also abundant in microorganisms capable to use mineral phosphorus compounds.

The rhizosphere effect was noted to be specific for different crop-plants. It seems that the rhizosphere of lupine (fig. 2) stimulates the

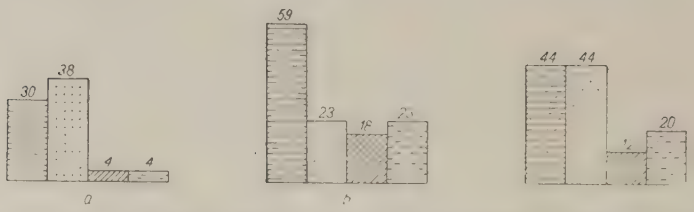


Fig. 1. Microbial populations playing a part in the transformations of phosphorus compounds in differents soils

Skład zespołów drobnoustrojów czynnych przy przemianach związków fosforowych w różnych glebach

a — pure sand * piasek * | *b* — sandy soil gleba piaszczysta | *c* — loess less

Notes to fig. 1, 2, and 3. — Objaśnienia do rys. 1, 2, 3.

Per cent of microorganisms belonging to the following „phosphorus" — groups:
W zespole mikroflory oznaczono procentową zawartość drobnoustrojów w następujących grupach:

utilizing likewise inorganic and organic phosphorus compounds
korzystające z fosforu ze związków mineralnych i organicznych

utilizing better inorganic phosphorus compounds
wykorzystujące lepiej fosfor mineralny

utilizing better organic phosphorus compounds
przyswajające lepiej fosfor organiczny;

transforming organic phosphorus into soluble phosphates
mineralizujące organiczne związki fosforowe;

dissolving $Ca_3(PO_4)_2$.
rozpuszczające trójzasadowy fosforan wapnia.

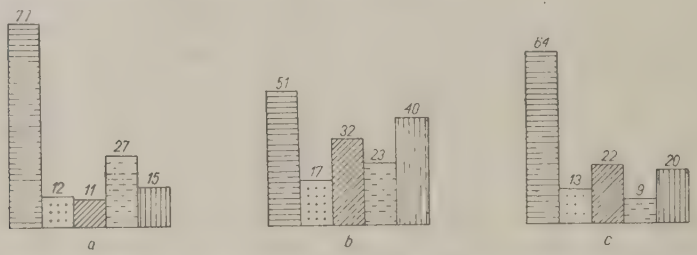


Fig. 2. Microbial populations playing a part in the transformations of phosphorus compounds in the rhizosphere of different plants

Skład zespołów drobnoustrojów czynnych przy przemianach związków fosforowych w rizosferze różnych roślin

a — Oats owies | *b* — Lupine łubin | *c* — Potatoes ziemniaki

Notes given at fig. 1. — Objaśnienia jak do rys. 1

* 18 per cent of isolated strains did not give any growth on semisolid agar — 18% szczepów nie rozwinęło się na półpłynnej pożywce agarowej.

growth of a microbial group, which has a special ability to dissolve $Ca_3(PO_4)_2$. On the other hand the ability of lupine to make use of difficult available phosphates is a well known fact. According to our present results, this may be due to the reinforced activity of soil microorganisms in respect to the conversion of insoluble phosphates into available forms.

When we compare the microbial population in the soil itself and in the rhizosphere (fig. 3), it seems evident, that the group of microorganisms utilizing better inorganic phosphorus compounds is more

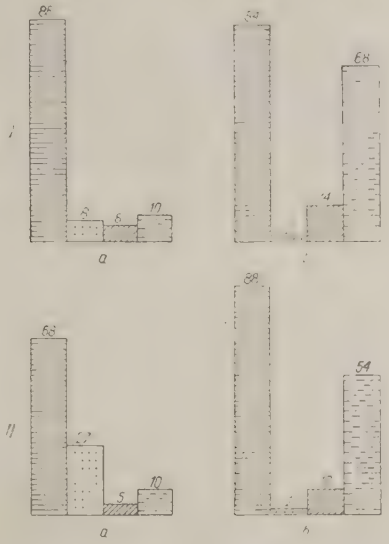


Fig. 3. Microbial populations playing a part in the transformations of phosphorus compounds in soil and in rhizosphere of ripe oats

Skład zespołów drobnoustrojów czynnych przy przemianach związków fosforowych w glebie i w rizosferze dojrzałego owsa.

I Sandy soil — *II* Loess
Gleba piaszczysta — Less

a soil — *b* rhizosphere
gleba — rizosfera

Notes given at fig. 1
Objaśnienia jak do rys. 1

developed in the soil itself than in the rhizosphere. On the contrary the rhizosphere may be more abundant in microorganisms better utilizing organic phosphorus and decomposing its compounds.

The chemical analyses have shown, that with the beginning of ripening and during the stage of plant maturity a relatively large amount of organic phosphorus compounds accumulates in the soil under the roots influence. This stage of plant growth probably affects positively the development of microorganisms capable to use the organic phosphorus compounds.

It has been also established, that the superphosphate application gave rise to an abundant growth of microorganisms, and that the reverse has been observed in our trials with phosphorite. But at the end of plant development the influence of the kind of phosphate fertilizers was no more visible.

Further microbial and chemical analyses are needed in order to reach a better understanding of the correlation existing between soil microbial populations. phosphorus transformations in the soil and the uptake of its compounds by the plants.

A. Mieczyńska i *J. Gołębiowska*

WPŁYW MIKROFLORY NA POBIERANIE FOSFORU PRZEZ ROŚLINY UPRAWNE

Streszczenie

Ogólnym celem tej pracy jest zbadanie, w jakim stopniu drobnoustroje rizosfery biorą udział w odżywianiu się roślin fosforem.

W przedstawionych tu wstępnych badaniach starałyśmy się wyjaśnić, czy i jaki wpływ na kształtowanie się zespołów mikroflory czynnej przy przemianach fosforu w rizosferze mogą mieć: typ gleby, rodzaj przedplonu i rodzaj nawożenia fosforowego. Badania prowadzono w doświadczeniach wazonowych w ciągu dwóch sezonów wegetacyjnych.

Z dotychczasowych wyników można wnioskować, że istnieje pewna zależność układu zespołów mikroflory od wymienionych czynników, określenie jej jednak jest bardzo trudne. W pracy podano niektóre przykłady zaobserwowanych zależności.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 133—135

B. Smyk i *A. Miłkowska*

WPŁYW PROMIENI PODCZERWONYCH NA DEZYNFEKCJĘ ZIARNA SIEWNEGO

KOMUNIKAT TYMCZASOWY

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej WSR w Krakowie

Dotychczasowe wyniki zastosowania promieni podczerwonych w przemyśle chemicznym i w przemyśle rolno-spożywczym oraz wykorzystanie prądów wielkiej częstotliwości (krótkie i ultrakrótkie fale) w biologii i lecznictwie skłoniły nas do podjęcia badań w kierunku wykorzystania promieni podczerwonych do dezynfekcji ziarna siewnego.

Bardzo ważnym i ciekawym zastosowaniem promieni podczerwonych na większą skalę jest podsuszanie zboża, zawierającego dużo wilgoci, przed jego składowaniem w magazynach oraz w suszarnictwie produktów rolno-spożywczych (Żywiel 1952).

Na podkreślenie zasługują również bardzo interesujące prace dotyczące zastosowania promieni podczerwonych (Bailey, Martini, Nachod 1953) w mikrobiologii. Promienie podczerwone działają silnie inaktywująco w sposób wybiórczy na różne grupy drobnoustrojów.

Jednym z ważnych zagadnień w rolnictwie, a szczególnie w produkcji roślinnej, jest sprawa dezynfekcji ziarna siewnego podstawowych zbóż uprawnych. Zagadnienie powyższe w zasadzie rozwiązywane było dotąd w praktyce na drodze kłopotliwych i kosztownych metod chemicznych. Metody te, aczkolwiek skuteczne, stały zawsze w sprzeczności z podstawami higieny pracy w rolnictwie.

W poszukiwaniu nowych i lepszych metod rozpoczęto w roku 1951 w Zakładzie Mikrobiologii Rolnej UJ w Krakowie (z inicjatywy i przy współpracy mgr Stobieckiego z CIOP-u) prace doświadczalne nad zastosowaniem promieni podczerwonych w dezynfekcji ziarna siewnego.

Celem pracy było zbadanie:

a) wpływu promieni podczerwonych na mikroflorę szkodliwą dla ziarna siewnego zbóż uprawnych: owsa, pszenicy i jęczmienia,

b) wpływ promieni podczerwonych na zdolność i energię kiełkowania zbóż,

c) ustalenie najlepszych warunków działania dezynfekującego promieni podczerwonych na ziarno siewne,

d) wpływu naświetlania na jakość zbóż uprawnych.

W latach 1951 - 1953 przeprowadzono 280 doświadczeń laboratoryjnych nad działaniem promieni podczerwonych z zastosowaniem różnego czasu i odległości na szkodliwą mikroflorę zbóż, a głównie: *Bacterium*

cerealinum, Fusarium herbarum, Penicillium expansum, Rhizopus nigricans oraz *Ustilago tritici, Ustilago hordei, Ustilago avenae, Ustilago maydis, Ustilago nuda* i *Tilletia tritici*, i 224 doświadczenia nad działaniem promieni podczerwonych na energię i zdolność kiełkowania zbóż. Badania powyższe z drobnoustrojami i grzybami fitopatogennymi (obniżającymi również zdolność kiełkowania i wartość enzymatyczną ziarna siewnego) przeprowadzono nie tylko z pojedynczymi szczepami, ale również i na całym zespole mikroflory występującej na badanych gatunkach zbóż. Prace nad *Tilletia tritici* (śnieć cuchnąca pszenicy) i *Ustilago maydis* są jeszcze w stadium eksperymentalnym.

Do badań nad wpływem promieni podczerwonych na energię i zdolność kiełkowania zbóż posłużyły trzy rodzaje zbóż. Doświadczenia polowe przeprowadzono w latach 1953 - 1955 na 24 poletkach doświadczalnych w RZD WSR w Chełmie z następującymi odmianami zbóż: owies — *„Biały Mazur"*, jęczmień — *„Krzeszowicki"* i *„Gambrinus"*, pszenica jara — *„Rokicka"* i *„Ostka Opolska"*.

W laboratoryjnych próbach doświadczalnych uwzględniono czas działania (emisji) i odległość promienników w zakresie: 10 sek - 10 min i 1 cm - 25 cm z równoczesnym ustaleniem najlepszych warunków działania wyjaławiającego promieni podczerwonych na ziarno siewne.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że promienie podczerwone działają zabójczo na wymienione drobnoustroje z odległości około 1 cm przy około 72-sekundowej emisji (przy zespole promienników typu Pc 250 - 12 i typu BG 1951 — RB i WJ), obniżając jednak zdolność i energię kiełkowania zbóż.

W próbach doświadczalnych wykazano, że promienie podczerwone działają bakteriobójczo na wszystkie bakterie pigmentotwórcze występujące na ziarnach badanych zbóż. Natomiast w stosunku do bakterii niepigmentotwórczych, pleśniaków oraz głowni (*in vitro*) działanie bakteriobójcze ma charakter zmienny. Za najlepsze warunki działania dezynfekcyjnego promieni podczerwonych na ziarno siewne można uważać odległość promiennika 5 - 10 cm przy 4-minutowej emisji, z tym jednak zastrzeżeniem, że podane warunki mogą być stosowane z pewnymi odchyleniami zależnie od rodzaju badanych zbóż. Wyżej cytowane warunki działania dezynfekcyjnego wpływają również aktywująco na energię kiełkowania zbóż.

W doświadczeniach polowych nie zaobserwowano ujemnego wpływu promieni podczerwonych na normalny rozwój badanych roślin uprawnych, a wykazano raczej korzystne działanie na odporność, zdrowotność i zwyżkę plonu.

Uzyskane wyniki doświadczeń laboratoryjnych i polowych upoważniają nas do wysnucia następujących wniosków:

a) promienie podczerwone (promienniki podczerwieni produkcji BG — 1951, konstrukcji RB i WJ) mogą być wykorzystane do dezynfekcji ziarna siewnego,

b) promienniki podczerwieni, powiększając energię kiełkowania zbóż, mogłyby być również wykorzystane w słodownictwie.

Otrzymane wyniki wymagają jednak potwierdzenia w badaniach enzymatycznych i fizjologicznych oraz w skali technicznej.

LITERATURA

1. Bailey J. H., Martini C. M. and Nachod F. C., 1953: Effect of certain antibacterial agents on the infra-red spectrum of *Micrococcus pyogenes var. aureus*, *J. Bact.*, 65:5.
2. Żywiel J., 1952: Suszenie podczerwienią produktów rolno-spożywczych. Prace Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego, Rok II, Zeszyt 1.

B. Smyk and *A. Miłkowska*

THE INFLUENCE OF INFRA-RED RAYS ON THE DESINFECTION OF GRAINS

Summary

The research was carried out in the laboratory and in the field with the following representatives of the phytopathogenic microflora: *Bacterium cerealinum*, *Fusarium herbarum*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus nigricans*, *Ustilago tritici*, *Ustilago hordei*, *Ustilago avenae* and others. In the field experiments no detrimental influence of infra-red rays on the normal development of the crop plants was observed. The resistance of plants and their crops were increased.

The optimal bacteriocidal and fungicidal dosis of radiation and the time of exposure of seeds were examined.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 137—140

J. Gołębiowska and *T. Wróbel*

DISTRIBUTION OF ANTAGONISTIC ACTINOMYCETES IN DIFFERENT SOILS

From the Department of Soil Microbiology, IUNG, Puławy

It is a well known fact, that the antagonistic microorganisms are widely distributed in natural conditions. Carvajal (1946) reports, that *Str. griseus* was isolated from soil, water, mud, plant roots, decaying vegetable matter, animal excrements and other materials. There is a common belief, that the soil is the best source of antagonistic actinomycetes. According to Routien and Finlay (1952) the appearance of antagonistic strains depends more on local ecological conditions than on the geographical ones. It seems necessary to study: the nature of the areas favorable for a rapid growth of actinomycetes, especially of their antibiotic strains, and to find out the chief factors which determine in the soil the formation of antibiotic mutants. Lindner and Wallhäuser (1955) examined about 40 000 soil samples and isolated about 25 000 cultures of antibiotic actinomycetes. From their datas it seems evident, that antagonistic actinomycetes are the most abundant in meadow soils (about 18 per cent) and the less abundant in garden and in compost soils (about 8 per cent).

In our investigations we tried also to study, how far is the qualitative composition of the population of actinomycetes variable in their natural medium.

Our preliminary trials were carried out with different materials. Variations in the distribution of antagonistic actinomycetes were noted in the rhizosphere of plants, on different parts of the same plants and in different soils.

Afterwards microbial populations of three soils: sandy soil, alluvial soil and loess were examined. The variability in the composition of actinomycetes populations was determined in different samples of these soils at different time of their storage.

The work was carried out using the plate-method with a subsequent culture of *Bac. subtilis* as a test organism.

In this way we determined in 19 samples of soil: 1) the total number of microorganisms, 2) the per cent of actinomycetes, and 3) the number of antibiotic producing strains among the actinomycetes.

During this study about 600 cultures of antagonistic actinomycetes were isolated. Their antimicrobial properties were verified with agar cross-streak method. *Bac. subtilis*, *Micrococcus pyogenes var. aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were employed for testing the activity of the antagonists.

All the isolated strains were divided into 20 groups according to their morphological and cultural properties. We tried to find out the relationships between the frequency of occurence of actinomycetes in several given groups and their antagonistic properties.

Our main conclusions are as follows:

1) The distribution of actinomycetes and the appearence of antagonistic strains is influenced by the character of their habitat. As a rule the number of actinomycetes is greater in the soils themselves than in the rhizosphere of plants. It seems impossible to obtain really antagonistic strains of actinomycetes from plant material. The appearance of active strains in the rhizosphere has to be considered as very rare, when in the soils the antagonistic actinomycetes seem to be much more common.

2) The antagonistic actinomycetes may be numerous in some soils while in others their appearing is only accidental. Among the investigated soils the most numerous antagonistic strains were found in alluvial soils. They were less numerous in sandy soil and in loess (table I).

Table I

Number of Actinomycetes giving an antagonistic effect upon *B. subtilis* in different soil samples

Liczebność promieniowców antagonistycznych względem *B. subtilis* w zespołach drobnoustrojów w różnych próbkach gleb

Sample of soil Próbka gleby		Number of investigated plates Liczba zbadanych płytek	Number of active strains Liczba szczepów aktywnych	Number of strains with different degree of activity — inhibition zones Liczba szczepów dających różne strefy hamowania — wielkość stref w mm				
				5 - 10	11 - 15	16 - 20	> 20	not determ. nieoznacz.
Alluvial soil Mada	A1	—	77	29	21	10	4	13
	A2	—	92	54	15	1	—	22
	A3	99	84	52	14	3	3	12
	A4	27	51	24	17	9	—	1
	A5	27	42	16	14	10	2	—
	A6	27	28	14	11	2	1	—
	A7	27	47	25	17	5	—	—
	A8	27	43	20	13	7	3	—
	A9	27	56	39	10	3	3	—
	A10	27	6	—	2	2	2	—
	A11	27	6	2	2	2	—	—
Sandy soil Gleba płaszczyzna	S1	99	90	66	22	2	—	—
	S2	27	30	23	4	1	—	2
	S3	27	21	19	1	1	—	—
	S4	27	25	19	6	—	—	—
	S5	27	20	14	6	—	—	—
Loess Less	L1	99	46	37	9	—	—	—
	L2	27	8	8	—	—	—	-
	L3	27	11	6	2	3	—	—
	L4	27	11	7	4	—	—	—
	L5	27	20	13	7	—	—	--

Table II

Number of strains of Actinomycetes found in different morphological groups and giving different antagonistic effects upon the test organisms

Liczebność promieniowców antagonistycznych w różnych grupach morfologicznych z uwzględnieniem siły ich działania na różne bakterie wzorcowe

Test organism Bakteria wzorcowa	Inhibition zones Strefy hamowania w mm	Groups of Actinomycetes — Grupy promieniowców																			
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
B. subtilis	0-5		5	3		2		5	2		5	7	15	8	21	5	12	6	—		10
	6-15	1	6	5	—	—	3	16	7	2	3	11	19	5	20	6	9	7	1	2	19
	16-20	2	4	—	—	—	3	8	2	—	—	2	5	5	3	2	5	4	—	—	3
	>20	1	3	3	1		6	2	12	1	15	6	11	14	23	6	8	7	3	—	11
M. pyogenes v. aureus	0-5	—	6	5	—	2	—	8	2	—	4	6	20	11	27	10	15	12	—	—	16
	6-15	3	4	3	—	—	6	16	9	—	1	9	12	3	7	1	9	5	1	2	12
	16-20	1	4				1	6	1	—	2	3	3	5	5	2	5	1	1		5
	>20	—	4	3	1	—	5	2	11	1	16	8	15	13	18	6	5	6	2	—	9
E. coli	0-5	3	17	11		2	11	27	11	2	6	9	29	14	38	15	23	17	3	1	28
	6-15	1	1	—	1	—	1	4	7	—	—	14	15	12	10	2	2	6	1	1	11
	16-20	—	—	—	—	—	—	1	1	—	3	1	3	3	7	—	3	1	—	—	4
	>20	—	—	—	—	—	—	—	4	1	14	2	3	3	2	1	6	—	—	—	—
Klebsiella pneumoniae	0-5	4	18	11		2	11	27	12	2	5	11	32	17	41	17	34	21	4	2	30
	6-15	—	—	—	1	—	—	—	3	—	2	11	14	4	10	—	3	2	—	—	10
	16-20						—	3	6		3	3	2	8	4	1	3	—	—	—	—
	>20	—	—	—	—	—	—	2	2	1	13	1	2	3	2	1	4	1	—	—	3
Total number of strains (Razem szczepów)		4	18	11	1	2	12	32	23	3	23	26	50	32	37	19	34	24	4	2	43

3) A correlation could be noted between the kind of a soil and the composition of its microbial population. Strains of actinomycetes characteristic for a given soil could be found there constantly. However the same species may appear as an active strain or as an inactive one. Among the investigated 20 groups of actinomycetes it was possible to distinguish those, in which are more abundant the organisms possessing desirable antimicrobial properties upon gram-positive bacteria, when in other groups numerous strains active against gram-negative bacteria could be noted (table II).

LITERATURE

1. Carvajal F., 1946: Biological strains of *Streptomyces griseus*. *Mycologia*, **38**: 596.
2. Lindner F., Wallhäuser K. H., 1955: Die Arbeitsmethoden der Forschung zur Auffindung neuer Antibiotica. *Arch. Mikrobiol.*, **22**: 219.
3. Routien J. B., Finlay A. C., 1952: Problems in the search for microorganisms producing antibiotics. *Bact. Rev.*, **16**: 51.

J. Gołębiowska i T. Wróbel

WYSTĘPOWANIE PROMIENIOWCÓW ANTAGONISTYCZNYCH W RÓŻNYCH GLEBACH

Streszczenie

Celem pracy było sprawdzenie, w jakich środowiskach najczęściej występują promieniowce antagonistyczne i czy w takich środowiskach bytuje stały zespół promieniowców o określonym składzie gatunkowym i o określonej częstotliwości występowania ras antagonistycznych, czy też zespoły te są zmienne.

Początkowo badania prowadzono na różnym materiale, określając nasilenie rozwoju promieniowców antagonistycznych w rizosferze różnych roślin, na nadziemnych częściach roślin i w różnych glebach. Następnie wielokrotnie przebadano pod tym względem zespoły mikroflory w próbkach trzech typów gleb: w madzie, szczerku i lessie.

Stwierdzono, że w glebach występuje więcej promieniowców antagonistycznych niż na roślinach. W badanych przez nas glebach stale najliczniej występowały promieniowce antagonistyczne w madzie, mniej licznie w szczerku, a najmniej było ich w lessie. W zespołach promieniowców w różnych glebach stale powtarzały się charakterystyczne dla tych zespołów gatunki. W warunkach naturalnych jeden i ten sam gatunek wytwarzał rasy silnie antagonistyczne obok ras słabo aktywnych.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 141—145

A. Luchterowa i *E. Markiel*

WPŁYW GAZU ZIEMNEGO NA ROZWÓJ BAKTERII METANOWYCH W GLEBIE

Z Pracowni Mikrobiologii Nafty Instytutu Naftowego w Krakowie

W Związku Radzieckim została opracowana metoda mikrobiologiczna w celu wyszukania nowych złóż ropy naftowej i gazu.

Oparta ona została z jednej strony na wynikach badań mikrobiologów, z drugiej zaś na wynikach badań geochemicznych, przeprowadzonych w warstwie podglebia terenów roponośnych. Badania mikrobiologów wykazały, że istnieją liczne drobnoustroje rozkładające węglowodory, zaś wyniki badań geochemicznych wytłumaczyły ich występowanie w warstwie podglebia istnieniem tam węglowodorów gazowych.

W pracowni Mikrobiologii Nafty w Instytucie Naftowym w Krakowie przeprowadza się badania nad zastosowaniem metod mikrobiologicznych do poszukiwań ropy naftowej.

Do hodowli bakterii wskaźnikowych zastosowano propan, gdyż występuje on jedynie w terenach naftowych. Wchodzi on w skład gazu ziemnego, tak zwanego gazolinowego. Metan zaś znajduje się nie tylko w terenach roponośnych.

Po wyhodowaniu bakterii w atmosferze mieszanki z propanem i stwierdzeniu, że nie rosną one w atmosferze powietrza w pożywkach bezwęglowych, zastosowano je jako szczepy wskaźnikowe. Rozwój ich w podglebiu świadczyłby o dopływie gazu ziemnego. Niekiedy jednak bakterie wskaźnikowe nie rozwijały się w znanych terenach roponośnych. Przyczyną tego mógł być nie tylko brak dopływu gazu ziemnego, ale również obecność czynników hamujących wzrost, jak siarkowodór, nieodpowiednia wilgotność powietrza glebowego i inne.

Wobec tego przystąpiliśmy do opracowania nowej metody. Obecnie postępujemy w ten sposób, że próby oceny roponośności terenu przeprowadzamy zarówno w terenie, jak i w pracowni. Pobrane próbki gleby wysiewamy na płytki żelowe i wstawiamy do komór w atmosferze metanu lub propanu.

W tym komunikacie przedstawiamy wyniki badań przeprowadzanych w komorach z metanem.

PRZEBIEG BADAŃ

Próbki gleby pobierano z głębokości 0,5 i 2 m ze specjalnie w tym celu wywierconych otworów. Gleby te umieszczano w sterylnych naczyniach i przewożono do laboratorium. W pracowni wysiewano gleby na płytki żelowe nasycone wyłącznie pożywką mineralną bezwęglową. Zaszczepione płytki umieszczano w eksykatorach w atmosferze mieszanki powietrza z metanem (1 3 część metanu, 2 3 części powietrza w temperaturze około 20°). Każdą próbkę gleby wysiewano na 10 płytek,

z których połowę umieszczano w atmosferze mieszanki powietrza z metanem, a drugą połowę dla kontroli w atmosferze samego powietrza. Po upływie 10 - 30 dni hodowli w temperaturze około 20° badano wzrost bakterii.

Zbadano występowanie bakterii metanowych w 8 próbkach gleb z terenów zawierających gaz ziemny (teren *D*), w 6 próbkach kontrolnych (teren *H*) i w 10 próbkach z terenów pod tym względem jeszcze nie zbadanych (teren *G*).

WYNIKI BADAŃ

Otrzymane wyniki przedstawiają się następująco:

Produkcyjny teren D — w którym jest obecny gaz ziemny bezgazolinowy.

Skład gazu

%	objętość	g/m³
metan	93,17	667,1
CO_2	0,21	3,9
O_2	0,71	9,9
N_2	5,91	73,8
		754,7

Gęstość gazu względem powietrza 0,583.

Na tym terenie (rys. 1) stwierdzono uprzednio zanik roślinności w pewnej odległości od odwiertu dla gazu (na rysunku zakreskowano). Pobrano tu próbki gleby w kilku punktach (oznaczono krzyżykami). Punkt *1* znajduje się w miejscu zaniku roślinności, punkt *2* — na skraju miejsca jej zaniku, punkt *3* — w miejscu gdzie roślinność rozwijała się normalnie, punkt *4* — w miejscu normalnego rozwoju roślinności, ale położonym w pobliżu odwiertu.

Zbadanie tych próbek wykazało, że w punktach *1* i *2*, tj. w obrębie miejsca zaniku roślinności, wzrost bakterii metanowych był bardziej aktywny niż w punktach o normalnie rozwiniętej roślinności. Należy zwłaszcza podkreślić dużą szybkość rozwoju bakterii z próbek pobranych z miejsc z zanikiem roślinności (tabela I). Z pomocą serii przeszczepień na płytki żelowe stwierdzono, że były to szczepy bakterii zdolne do rozwoju w atmosferze metanu jako jedynego źródła węgla.

Teren *G* — w którym przypuszczalnie występuje ropa naftowa.

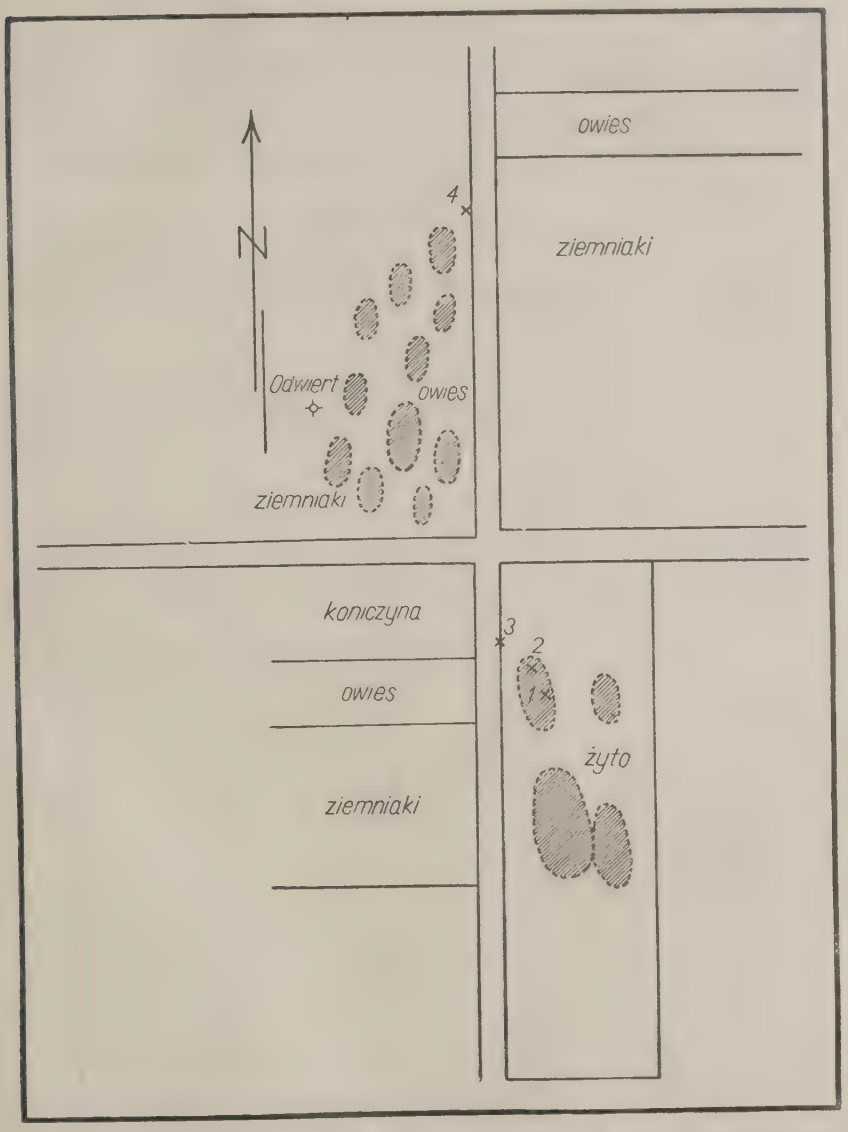
Próbki gleby pobrane zostały z 10 otworów z głębokości 0,5 i 2 m. Próbki te wysiane zostały jak poprzednio na płytki żelowe i umieszczone w atmosferze mieszanki powietrza z metanem oraz dla kontroli w atmosferze powietrza. Po 10 dniach hodowli w warunkach wyżej podanych nie stwierdzono rozwoju bakterii na żadnej z płytek. Wyniki dodatnie otrzymano dopiero po 30 dniach (tabela I).

Na kontrolnych płytkach (tj. umieszczonych w atmosferze samego powietrza) wzrostu w ogóle nie stwierdzono.

Szczepy uzyskane w atmosferze metanu korzystały z niego jako jedynego źródła węgla.

Teren *H* — w którym nie stwierdzono występowania ropy lub gazu ziemnego.

Pierwotnie pobrano 3 próbki gleby z głębokości 0,5 i 1 m. Po upływie 20 dni hodowli w temperaturze około 20° nie stwierdzono rozwoju bakterii metanowych. Wynik pozytywny uzyskano po upływie 30 dni i tylko



Rys. 1. Plan sytuacyjny terenu *D* w pobliżu odwiertu gazowego (skala 1 : 1500)
Fig. 1. Sketch-map of the examined area (1 : 1500)

na jednej płytce. Powtórnie pobrano próbki gleby z 3 punktów z głębokości 0,5 i 2 m. Każdą próbkę wysiano na 5 równoległych płytek. Stwierdzono rozwój drobnoustrojów w atmosferze metanu tylko na 2 płytkach (tabela I).

Tabela I

Wyniki hodowli bakterii z próbek gleby w atmosferze mieszanki powietrza z metanem

Presence of bacteria growing in methane athmosphere (as sole carbon source) in various soil samples

Próbka Sample	Głębokość w m Depth in m	Wyniki badań po upływie Results of examination after		
		10 dni 10 days	20 dni 20 days	30 dni 30 days
		Teren gazonośny (*D*) Area where the presence of natural gas was confirmed		
I	0,5	3/2	5/0	5/0
I	2,0	4/1	5/0	5/0
II	0,5	4/1	5/0	5/0
II	2,0	3/2	3/2	4/1
III	0,5	0/5	2/3	3/2
III	2,0	2/3	2/3	2/3
IV	0,5	0/5	2/3	2/3
IV	2,0	1/4	3/2	5/0
		Teren, w którym podejrzewa się obecność gazu (*G*) Area where the presence of natural gas was dubious		
I + II	0,5	0/5	0/5	3/2
I + II	2,0	0/5	0/5	0/5
III + IV	0,5	0/5	0/5	2/3
III + IV	2,0	0/5	0/5	1/4
V + VI	0,5	0/5	0/5	2/3
V + VI	2,0	0/5	0/5	2/3
VII + VIII	0,5	0/5	0/5	2/3
VII + VIII	2,0	0/5	0/5	2/3
IX + X	0,5	0/5	0/5	3/2
IX + X	2,0	0/5	0/5	3/2
		Teren kontrolny (*H*) — Control area		
I + II + III	0,5	0/5	0/5	1/4
I + II + III	1,0	0/5	0/5	0/5
IV	0,5	0/5	0/5	0/5
IV	2,0	0/5	0/5	0/5
V	0,5	0/5	0/5	0/5
V	2,0	0/5	0/5	0/5
VI	0,5	0/5	0/5	2/3
VI	2,0	0/5	0/5	0/5

Objaśnienia: licznik — ilość płytek, na których bakterie wyrosły, mianownik — ilość płytek bez wzrostu; numerator — number of Petri dishes, where growth of bacteria was present; denominator — number of Petri dishes on which the growth of bacteria was absent.

OGÓLNE WNIOSKI

Stwierdzono, że w glebach terenów gazonośnych obecne są bakterie mogące szybko rozwijać się na metanie jako na jedynym źródle węgla. Ponieważ w nasileniu rozwoju bakterii metanowych, pochodzących z różnych terenów, zaznaczają się wyraźne różnice, obecnie przystąpiono do opracowania mikrobiogicznej skali porównawczej dla różnych terenów.

A. Luchterowa and *E. Markiel*

EFFECT OF NATURAL GAS ON GROWTH OF BACTERIA UTILIZING METHANE IN SOIL

Summary

This report is a part of a research conducted for some years with the aim to find the best microbiological method for oil prospecting.

Soil samples were collected from three areas — the first where natural gas was known to be present, second — dubious, and third — where natural gas could not be detected.

Bacteria were grown on silica-gel with mineral solution. The only accesible source of carbon for bacteria was given in the form of gaseous methane.

It was shown previously that on this medium developed only these bacteria which could utilize methane as source of carbon.

The bacteria growing on this medium were found in all soil samples collected from the first area (natural gas present) and in majority of samples from the second area (presence of natural gas dubious). No bacteria able to grow in this medium could be detected in majority of samples from the third area (natural gas absent). (Table I).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 147—163

T. Lityński, H. Jurkowska i *D. Pieniak*

WPŁYW FLUORU NA KROPIDLAKA (*ASPERGILLUS NIGER*)

Z Katedry Chemii Rolnej WSR w Krakowie

Fluor jest stałym towarzyszem fosforu, toteż dostaje się do gleby po największej części z nawozami fosforowymi, które zawierają zawsze pewne ilości tego pierwiastka. Dla przykładu wystarczy podać, że w najbardziej znanym nawozie fosforowym, jakim jest superfosfat, znajduje się on w ilości około 1%. Ponieważ superfosfat jest powszechnie stosowanym nawozem fosforowym, przeto ilości fluoru, jakie wraz z nim dostają się do gleby, są bardzo duże. Obliczono, że wynoszą one 130 tysięcy ton rocznie (B r e d e m a n n 1951).

Już ten fakt każe nam bliżej zainteresować się fluorem. Wprowadzony bowiem do gleby może on oddziaływać na drobnoustroje glebowe i rośliny wyższe, a więc wpływać dodatnio lub ujemnie na rozwój i plon roślin uprawnych. Poznanie jego działania jest więc zagadnieniem ciekawym zarówno dla fizjologa jak i rolnika. Problem ten tym bardziej zyskuje na aktualności, że prawdopodobnie w niedługiej przyszłości ilości fluoru doprowadzane do gleby wraz z nawozami fosforowymi ulegną poważnej redukcji. Fluorem bowiem zainteresowany jest przemysł chemiczny jako bazą surowcową przemysłu aluminiowego oraz syntezy nieorganicznych i organicznych połączeń tego pierwiastka. Wyzyskanie do tego celu fluoru znajdującego się w apatytach i fosforytach i po większej części przechodzącego do nawozów fosforowych może zmniejszyć import surowców fluorowych więcej niż o połowę.

Literatura dotycząca wpływu fluoru na rośliny, jakkolwiek dość obszerna, nie wyczerpuje jednak całości zagadnienia, a wiele problemów na temat roli tego pierwiastka w życiu roślin jest nam dotąd nieznanych. Nie będziemy cytować tu całej tej literatury, zebranej zresztą ostatnio w książce B r e d e m a n n a (1951).

Przytoczymy tylko niektóre prace dotyczące działania fluoru na drobnoustroje glebowe. I tak G i s i g e r stwierdził jego pobudzające działanie na bakterie glebowe, przy czym najintensywniejszy rozwój bakterii przypadał na dawkę 2 g fluorku sodu na 1 kg gleby. Także L e r o u x stwierdził wzrost utleniania substancji organicznej w glebie oraz wzmożenie nitryfikacji na skutek dodatku niewielkiej ilości fluoru. Również i na wiązanie azotu przez bakterie brodawkowe małe ilości fluoru wpływały dodatnio. Podczas gdy w doświadczeniu wazonowym z grochem przybytek azotu za okres od 6 kwietnia do 29 czerwca bez

fluoru wynosił tylko 26 mg, w tym samym czasie w obecności 2 mg fluoru wyniósł on 243 mg, a z dodatkiem 5 mg aż 334 mg (oba cytaty wg Bredemanna 1951).

Grzyby są bardziej odporne na działanie fluoru aniżeli rośliny wyższe. Loew (wg Pirschle 1934) tłumaczy trujący wpływ fluoru wiązaniem wapnia w komórce. Wobec tego organizmy, dla których wapń nie jest konieczny, słabiej reagują na szkodliwe działanie fluoru. Pobudzający wpływ małych dawek fluoru na kropidlaka (*Aspergillus niger*) stwierdzili Richards (według Pirschle 1934) i Ono (1900). W odróżnieniu od nich Pirschle (1934) nie obserwował stymulującego działania tego pierwiastka nawet przy dawkach bardzo niskich (1/100-milionowa mola). W dawkach większych obserwował działanie toksyczne, wyrażające się obniżeniem plonu grzybni oraz zahamowaniem zarodnikowania. Porównując toksyczność fluoru z toksycznością innych chlorowców stwierdził on najbardziej trujące działanie fluoru, następnie jodu, słabszymi natomiast truciznami był brom i chlor. Toksyczne działanie fluoru zależy jego zdaniem od rodzaju kationu, jaki mu towarzyszy. Stosunkowo mało trujący jest fluorek wapnia, co tłumaczy się słabą rozpuszczalnością tego związku. Praca Borei (1940) wskazuje na uszkadzające działanie fluoru na procesy utleniania w komórkach drożdży.

Ono (1900) stwierdził stymulujący wpływ fluoru na glony, przy czym optymalne stężenia fluoru dla glonów były znacznie niższe aniżeli dla grzybów.

BADANIA WŁASNE

METODYKA

Badania prowadzono z czystą hodowlą kropidlaka czarnego — (*Aspergillus niger*). W doświadczeniach stosowano pożywkę Pfeffera (według Wolf i Wolf 1947), zawierającą w 1 litrze wody destylowanej 50 g cukru, 10 g NH_4NO_3, 3 g KH_2PO_4, 2.5 g $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ oraz ślady $Fe_2(SO_4)_3$, *pH* pożywki wynosiło 4,3. Pożywkę w ilości po 100 ml rozlewano do kolb Erlenmeyera ze szkła jenajskiego o pojemności 300 ml i wyjaławiano dwukrotnie w odstępach jednodniowych przez 1 godzinę w temperaturze 100°.

Fluor stosowano w postaci fluorku sodu (NaF), dodając go w postaci roztworu wodnego do kolb przed sterylizacją. Dodatek fluorku sodu, za wyjątkiem najwyższych dawek (począwszy od 0,2% F), nie zmieniał odczynu pożywki. Przy dawkach najwyższych podnosiło się nieco *pH*.

Przygotowując pożywki o niższym *pH* aniżeli 4.3, zakwaszano je przed wyjaławianiem 1/10 N kwasem solnym. Przygotowując pożywki o *pH* wyższym alkalizowano je 1/10 N ługiem sodowym również przed sterylizacją. W pożywkach, do których dodawano ługu, wytwarzał się nieznaczny osad, ulegający podczas rozwoju pleśni rozpuszczeniu.

W doświadczeniach, w których badano wpływ fluoru na kropidlaka hodowanego na różnych źródłach azotu, stosowano azot w postaci NH_4NO_3, $NaNO_3$ oraz $(NH_4)_2SO_4$, przy czym procentowa zawartość azotu w pożywce niezależnie od formy była jednakowa i odpowiadała zawartości tego składnika w pożywce Pfeffera (0,35 g w 100 ml).

W doświadczeniach ze wzrastającymi dawkami fosforu użyto zamiast fosforanu potasu (KH_2PO_4) fosforan sodu ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), przy czym dawki fosforu wynosiły 0,034, 0,0681, 0,1362 i 0,2724 g P w 100 ml pożywki. Potas dano w postaci K_2SO_4 w ilości takiej, jaką zawiera pożywka Pfeffera (0,0861 g K w 100 ml).

W doświadczeniach, w których użyto węgla brunatnego (węgiel brunatny z Konina) oraz gleby (gleba lekka z Mydlnik, *pH* w H_2O 6), obie te substancje zastosowano w ilości po 0,25 g na 100 ml pożywki. Krzem użyto w postaci krzemianu potasu (K_2SiO_3) w ilości 0,25 g na 100 ml. Dodanie krzemianu do pożywki wywoływało tworzenie się osadu, który rozpuszczał się w czasie wzrostu pleśni.

Wszystkie ze stosowanych odczynników, z wyjątkiem fluorku sodu, były produktami firmy Merck (*pro analysi*), fluorek sodu — firmy The British Drug Houses Ltd.

Szczepienia pożywki dokonywano przy pomocy ezy platynowej, pobierając zarodniki z hodowli wyrosłej na agarze skośnym.

Hodowlę prowadzono w termostacie przez 5 dni, w temperaturze 30°.

Ilość powtórzeń w poszczególnych doświadczeniach i seriach była różna, uzależniano ją bowiem od ilości potrzebnego do analiz materiału. Wszystkie liczby przytaczane w tabelach są średnimi arytmetycznymi otrzymanych wyników.

Po zakończeniu hodowli grzybnię oddzielano od pożywki przez odsączenie i przemywano wodą destylowaną, którą zbierano wraz z przesączem do kolby miarowej.

W celu oznaczenia suchej masy grzybni suszono ją początkowo w temperaturze 60°, a następnie podwyższano temperaturę do 100° i suszono do otrzymania stałej wagi.

Zawartość ogólnego fosforu w grzybni oznaczano metodą Lorenza po uprzednim spaleniu jej według metody Neumana *.

Do oddzielenia fosforu nukleinowego (łącznie z fosforem lipoidowym) od fosforu mineralnego i fosforu tzw. frakcji heksozofosforowej użyto 1-procentowego kwasu solnego (wg Koehlera, 1926). Odczynnik ten przeprowadza do roztworu ostatnie z wymienionych związków fosforowych, pozostawiając w grzybni związki nukleinowe i lipoidowe. Odejmując więc od P całkowitego grzybni tzw. całkowity P wyciągowy w 1-procentowym kwasie solnym, otrzymujemy ilość P nukleinowego (łącznie z P lipoidowym). 1-procentowego HCl użyto dlatego, że w roztworach mniej kwaśnych, jakie daje dawniej stosowany kwas octowy, powstają straty związków heksozofosforowych z białkami, na skutek czego wyniki dla tych ostatnich wypadają za małe, a dla związków nukleinowych zbyt duże (Koehler 1926, Przyłęcki i Grynberg 1932). W środowisku bardziej kwaśnym nie dochodzi natomiast do tworzenia się owych kompleksów połączeń heksozofosforowych z białkami, a wyniki uzyskuje się bardziej rzetelne.

W wyciągu w 1-procentowym HCl określano ilość P mineralnego i P tzw. frakcji heksozofosforowej przez strącenie pierwszego za pomocą mieszaniny magnezowej i oznaczenie według metody Lorenza, drugiego zaś z różnicy między całkowitym P wyciągowym a P mineralnym, wychodząc z tej własności związków heksozofosforowych, że z solami magnezowymi tworzą one połączenia rozpuszczalne w wodzie.

Odczyn pożywek określano metodą potencjometryczną.

Kwasowość ogólną pożywek oznaczano na drodze miareczkowania 1 10 N ługiem sodowym wobec fenolftaleiny jako indykatora.

Ilości cukru zużyte przez pleśń obliczano z różnicy między zawartością cukru w pożywce przed i po wegetacji. Cukier oznaczano metodą Bertranda.

Ilości pobranego przez grzyb azotu amonowego i azotanowego obliczano z różnicy między pierwotną zawartością tych form azotu w pożywce a ich zawartością po skończonej hodowli. Azot oznaczano metodą Kjeldahla.

OPIS DOŚWIADCZEŃ I WYNIKI

a) Wpływ wzrastających dawek fluoru na rozwój i przemianę materii kropidlaka.

Celem tego doświadczenia było zbadanie wpływu wzrastających dawek fluoru na rozwój oraz przemianę materii kropidlaka. Fluor zastosowano w następujących stężeniach: 0, 0,00004, 0,0002, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,2 i 0,4% F. Wpływ fluoru zaznaczył się wyraźnie w wyglądzie grzybni.

* Spośród rozmaitych kategorii związków fosforowych składających się na fosfor całkowity grzybni oznaczano: fosfor nukleinowy (łącznie z lipoidowym), fosfor mineralny oraz fosfor tzw. frakcji heksozofosforowej.

jej plonie oraz zdolności zarodnikowania. Grzybnię w dniu zbioru przedstawia fot. 1 (Tabl. VI, po str. 160).

Opis grzybni w dniu zbioru oraz wagę plonów suchej masy grzybni zestawiono w tabeli I.

Tabela I

Wpływ wzrastających dawek fluoru na wzrost kropidlaka
Effect of fluorine on growth of *A. niger*

Nr serii Serie N°	Zawartość F w pożywce w % Concentration of F per cent	Opis grzybni Description of mycellium	Plon suchej masy grzybni Yield — dry weight of mycellium	
			w g in grams	w % plonu bez F per cent of yield without F
1	0	grzybnia biała, silnie pofałdowana, nieliczne zarodniki	0,9601	100
2	0,00004	„	1,1400	119
3	0,0002	„	1,0121	105
4	0,001	grzybnia biała, nieco słabiej pofałdowana, b. nieliczne zarodniki	0,7917	82
5	0,005	grzybnia biała, nieznaczne fałdy, brak zarodników	0,2474	26
6	0,01	grzybnia biała, cienka, nie pokrywająca całej powierzchni pożywki, brak zarodników	0,2058	21
7	0,05	liczne wysepki białej, b. cienkiej grzybni, brak zarodników	0,1019	11
8	0,2	śluzowata wysepka grzybni, brak zarodników	0	0
9	0,4	brak rozwoju	0	0

Tabela II

Wpływ wzrastających dawek fluoru na zużycie cukru i produkcję kwasów
Effect of fluorine on utilisation of sugar and production of acids

Nr serii Serie N°	Zawartość F w pożywce w % Concentration of F per cent	Plon suchej masy grzybni w % plonu bez F Yield (dry weight of mycellium) per cent of the yield without F	pH pożywki po wegetacji pH of culture medium after vegetation	Kwasowość ogólna pożywki po wegetacji w ml 1/10 N NaOH Acidity of a medium after vegetation (ml of 1/10 N NaOH)	Ilość zużytego cukru Amount of sugar consumed	
					całkowita w g total in grams	na wyprodukowanie 1 g suchej masy grzybni w g per 1 g of dry weight of mycellium
1	0	100	2,40	75	3,24	3,47
2	0,00004	119	2,40	75	3,53	3,10
3	0,0002	105	2,58	43	3,15	3,11
4	0,001	82	2,60	13	2,85	3,60
5	0,005	26	3,00	10	1,57	6,35
6	0,01	21	3,20	6	1,57	7,33
7	0,05	11	3,60	2	0,90	8,83

Aby przekonać się, czy stężenia 0,2 i 0,4-procentowego F tylko opóźniły, czy też uniemożliwiły zupełnie rozwój pleśni, odpowiednie hodowle pozostawiono w termostacie przez 30 dni. Przy stężeniu 0,2% F grzybnia rozwijała się nadal, choć nadzwyczaj powoli. Niektóre zarodniki po skiełkowaniu i utworzeniu małej śluzowatej wysepki grzybni nie rozwijały się i opadały na dno kolby. Przy stężeniu 0,4% F zarodniki w ogóle nie skiełkowały.

Wyniki oznaczeń dotyczących zużycia cukru oraz produkcji kwasów pod wpływem wzrastających dawek fluoru, wpływu fluoru na metabolizm fosforowy i na pobieranie azotu przez kropidlaka przedstawiają tabele II — IV.

Tabela III

Wpływ wzrastających dawek fluoru na pobieranie i przeróbkę fosforu
Effect of fluorine on assimilation and metabolism of phosphorus

Nr serii Serie N°	Zawartość F w pożywce w % Concentration of F per cent	Zawartość P_2O_5 w grzybni w % P_2O_5 content of mycellium per cent	Fosfor pobrany przez grzyba w mg P_2O_5 Phosphorus assimilated in mg of P_2O_5	W % P ogólnego Per cent of P total			
				P mineralny P mineral	P organiczny P organic	P nukleinowy P nucleic	P heksozofosforowy P hexose phosphate
1	0	2,44	23,43	74,2	25,8	16,6	9,2
2	0,00004	2,43	27,70	nie oznaczono — not determined			
3	0,0002	2,20	22,27	nie oznaczono — not determined			
4	0,001	2,06	16,31	73,7	26,3	6,6	19,7
6	0,01	1,61	3,31	75,7	24,3	8,3	16,0

Tabela IV

Wpływ wzrastających dawek fluoru na pobieranie azotu
Effect of fluorine on assimilation of nitrogen

Nr serii Serie N°	Zawartość F w pożywce w % Concentration of F per cent	Plon suchej masy grzybni w % plonu bez F Yield (dry weight of mycellium) per cent of the yield without F	Zawartość N w grzybni w % N content of mycellium per cent	$N—NH_4$ pobrany w mg Ammonium nitrogen assimilated in mg	$N—NO_3$ pobrany w mg Nitrate nitrogen assimilated in mg	Stosunek ilości pobranego $N-NH_4$ do ilości $N-NO_3$ Ratio of ammonium nitrogen to nitrate nitrogen assimilated
1	0	100	3,36	22,0	10,3	2,13
4	0,001	82	3,54	13,0	15,1	0,86
6	0,01	21	11,90	11,0	13,5	0,81
7	0,05	11	10,89	5,0	6,1	0,81

Ponieważ w poprzednim doświadczeniu (tabela I) niskie dawki fluoru (0,00004% i 0,0002% F) nieco zwiększyły plon grzybni, należało zbadać, czy te odchylenia były przypadkowe, czy też istnieją stężenia, w których fluor działa stymulująco. Dlatego założono nową hodowlę rozszerzając zakres stężeń fluoru (0, 0,00001, 0,00002, 0,00004, 0,00008, 0,00016, 0,00032,

0,00064, 0,00128, 0,00256, 0,01, 0,04, 0,16 oraz 0,64% F). Wpływ wzrastających dawek fluoru i tutaj zaznaczył się w wyglądzie grzybni, zdolności zarodnikowania i w plonie wytworzonej grzybni, jak to podaje tabela V.

Tabela V

Wpływ wzrastających dawek fluoru na wzrost kropidlaka
Effect of fluorine on growth of *A. niger*

Nr serii Serie N°	Zawartość F w pożywce w % Concentration of F per cent	Opis grzybni Description of mycellium	Plon suchej masy grzybni Yield (dry weight of mycellium	
			w g in grams	w % plonu bez F per cent of the yield without F
1	0	grzybnia biała, silnie pofałdowana, zarodnikowanie obfite	1,5472	100
2	0,00001	„	1,6224	104
3	0,00002	„	1,5171	98
4	0,00004	„	1,5860	102
5	0,00008	„	1,5775	101
6	0,00016	„	1,5485	100
7	0,00032	„	1,4100	91
8	0,00064	„	1,2466	81
9	0,00128	grzybnia biała, nieco słabiej pofałdowana, brak zarodników	0,9957	64
10	0,00256	„	0,6372	41
11	0,01	grzybnia biała, nie pokrywa całej powierzchni pożywki, brak zarodników	0,2805	18
12	0,04	„	0,1421	9
13	0,16	śluzowata wysepka grzybni, brak zarodników	0	0
14	0,64	brak rozwoju	0	0

W doświadczeniu tym, podobnie jak w doświadczeniu poprzednim, oznaczano odczyn pożywki po wegetacji, kwasowość ogólną oraz zużycie cukru. Uzyskane wyniki potwierdzają dane znalezione poprzednio (tabela II) wobec czego nie cytujemy ich tutaj.

b) Wpływ różnych czynników na toksyczność fluoru na kropidlaka.

Spośród różnych czynników, które mogłyby wpływać dodatnio albo ujemnie na toksyczność fluoru zwrócono uwagę na następujące: różne dawki fosforu, różne źródła azotu, odczyn pożywki, dodatek węgla brunatnego, gleby lub krzemianu.

1. Wpływ różnego poziomu fosforu w pożywce na trujące działanie fluoru. W doświadczeniu tym fosforan jednozasadowy sodu zastosowano w następujących dawkach: 0, 0,034, 0,0681, 0,1362 i 0,2724% P. Hodowlę prowadzono na pożywkach bez fluoru oraz z fluorem o stężeniu 0,01% F. Wyniki oznaczeń suchej masy grzybni oraz opis grzybni w dniu zbioru podaje tabela VI.

Tabela VI

Wpływ wzrastających dawek fosforu na toksyczność fluoru

Relationship between the kind of phosphorus nutrition and the toxicity of fluorine

Nr serii Serie N°	Zawartość P w pożywce w % Concentration of P per cent	Opis grzybni na pożywce bez F Description of a mycellium in the medium not containing F	Sucha masa grzybni (bez F) Dry weight of mycellium (without F)	Opis grzybni na pożywce z F Description of mycellium in the medium containing F	Sucha masa grzybni na pożywce z F Dry weight of mycellium on medium containing F
1	0	małe, śluzowate wysepki grzybni, liczne zarodniki	0	małe, śluzowate wysepki grzybni, brak zarodników	0
2	0,034	grzybnia biała silnie pofałdowana, b. liczne zarodniki	1,6450	grzybnia biała, słabo rozwinięta, nie pokrywa całej pow. poż. brak zarodników	0,3175
3	0,0681	„	1,8145	„	0,3200
4	0,1362	„	2,1444	„	0,3225
5	0,2724	„	2,3342	„	0,3370

Tabela VII

Wpływ źródła azotu na toksyczność fluoru

Relationship between the kind of nitrogen nutrition and the toxicity of fluorine

Nr serii — Serie N°	Wariant doświadczalny Source of nitrogen	Opis grzybni na pożywce bez F Description of mycellium on a medium not containing F	Sucha masa grzybni (bez F) w g Dry weight of mycellium (without F) in grams	Opis grzybni na pożywce z F Description of mycellium on a medium containing F	Sucha masa grzybni na pożywce z F Dry weight of mycellium on a medium containing F	
					w g in grams	w % plonu bez F per cent of yield without F
1	NH_4NO_3	grzybnia biała, silnie pofałdowana, dość liczne zarodniki	1,5035	grzybnia biała, rozwój słaby, nie pokrywa całej pow. poż., brak zarodników	0,1278	8,5
2	$NaNO_3$	grzybnia biała, nie pofałdowana, b. liczne zarodniki	0,8508	grzybnia biała, cienką warstwą pokrywa pow., brak zarodników	0,3662	43,0
3	$(NH_4)_2SO_4$	grzybnia biała, słabo pofałdowana, liczne zarodniki	1,0500	kępki grzybni, brak zarodników	0,0221	2,1

2. Wpływ różnych źródeł azotu w pożywce na trujące działanie fluoru. Jak to wynika z doświadczenia, w którym badano pobieranie azotu

amonowego i azotu azotanowego przez kropidlaka, grzyb w obecności fluoru przestawiał swoją selektywność, przyswajając więcej azotu azotanowego (tabela IV). Dla potwierdzenia naszego przypuszczenia, że azot azotanowy jest w obecności fluoru lepszym pokarmem azotowym dla kropidlaka aniżeli azot amonowy, założono hodowlę z trzema źródłami azotu, a to: azotanem amonu, azotanem sodu i siarczanem amonu. Hodowlę prowadzono w dwu kombinacjach bez fluoru oraz z fluorem w stężeniu 0,01% F. *pH* pożywki wynosiło 3,8. Wyniki doświadczenia przedstawia fot. 2 (Tabl. VI), wykonana w dniu zbioru grzybni oraz tabela VII.

3. Wpływ stężenia jonów wodorowych na trujące działanie fluoru. Aby przekonać się, jaki wpływ ma odczyn podłoża na toksyczność fluoru, przeprowadzono doświadczenie zakładając hodowlę kropidlaka bez fluoru oraz z 0,01-procentowym F przy różnym *pH* (1,6, 2,3, 2,8, 4,3, 5,2, 5,8, 6,5). Wygląd grzybni w dniu zbioru na pożywkach bez fluoru ilustruje fot. 3, zaś grzybni z fluorem fot. 4 (Tabl. VI).

Plony zebranych grzybni przedstawia tabela VIII.

Tabela VIII

Wpływ odczynu pożywki na toksyczność fluoru
Effect of *pH* on the toxicity of fluorine.

Nr serii Serie N°	*pH*	Opis grzybni Description of mycellium	Sucha masa grzybni Dry weight of mycellium	
			w g in grams	w % plonu bez F per cent of yield without F
		bez fluoru — no fluorine		
1	1,6	grzybnia biała, dość słabo rozwinięta, brak zarodników	0,6522	
2	2,3	grzybnia biała, silnie pofałdowana, nieliczne zarodniki	0,8734	
3	2,8	grzybnia biała, silnie pofałdowana, b. liczne zarodniki	1,3427	
4	4,3	„	1,2395	
5	5,2	„	1,2930	
6	5,8	„	1,2200	
7	6,5	„	1,1501	
		0,01% F		
1	1,6	brak rozwoju	0	0
2	2,3	„	0	0
3	2,8	„	0	0
4	4,3	grzybnia biała, nie pokrywa całej pow. poż., brak zarodników	0,2005	16,1
5	5,2	„	0,3285	25,4
6	5,8	grzybnia biała, cienką warstwą pokrywa całą pożywkę, brak zarodników	0,3890	31,9
7	6,5	„	0,4250	37,0

O ile w doświadczeniu poprzednim badaliśmy wpływ odczynu pożywki na toksyczność fluoru przy jednym i tym samym stężeniu fluoru (0.01% F), w niniejszym doświadczeniu chodziło nam o zbadanie wpływu odczynu przy różnym stężeniu jonów fluoru. Przebadaliśmy stężenia 0, 0.001, 0.01, 0.1% F przy *pH* 2.3, 2.8, 3.8, 5.8. Wyniki doświadczenia zebrano w tabeli IX.

Tabela IX

Wpływ odczynu na toksyczność fluoru
Effect of *pH* on the toxicity of fluorine

Nr serii Serie N°	Zawartość F w pożywce % Concetration of F per cent	Opis grzybni Description of mycellium	Sucha masa grzybni Dry weight of mycellium	
			w g in grams	w % plonu bez F per cent of yield without F
		pH pożywki 2,3 — *pH* of the medium 2,3		
1	0	grzybnia biała, słabo rozwinięta, brak zarodników	0,7850	100
2	0,001	grzybnia biała, nie pokrywa całej pow. poż., brak zarodników	0,3000	38,2
3	0,01	brak rozwoju	0	0
4	0,1	„	0	0
		pH pożywki 2,8 — *pH* of the medium 2,8		
5	0	grzybnia biała, dość dobrze rozwinięta, brak zarodników	1,2825	100
6	0,001	grzybnia biała, cienką warstwą pokrywa całą pow. poż., brak zarodników	0,5516	43,0
7	0,01	brak rozwoju	0	0
8	0,1	„	0	0
		pH pożywki 3,8 — *pH* of the medium 3.8		
9	0	grzybnia biała, dość dobrze rozwinięta, nieliczne zarodniki	1,0254	100
10	0,001	grzybnia biała, cienką warstwą pokrywa całą pow. poż., b. nieliczne zarodniki	0,6110	59,6
11	0,01	kępki grzybni, brak zarodników	0,1930	18,8
12	0,1	maleńkie kępki grzybni, brak zarodników	0,0203	1,9
		pH pożywki 5.8 — *pH* of the medium 5.8		
13	0	grzybnia biała, dość dobrze rozwinięta, dość liczne zarodniki	1,0401	100
14	0,001	grzybnia biała, cienką warstwą pokrywa całą pow. poż., b. nieliczne zarodniki	0,6850	65,8
15	0,01	grzybnia biała, słabo rozwinięta, nie pokrywa całej pow. poż., brak zarodników	0,2380	25,8
16	0,1	kępki grzybni, brak zarodników	0,0315	3,0

4. Wpływ dodatku węgla brunatnego na trujące działanie fluoru. Wobec znanych antytoksycznych właściwości węgla brunatnego badano wpływ dodatku węgla brunatnego (w dawce 0,25 g węgla na 100 ml pożywki) na toksyczność fluoru przy stężeniu 0,01% F. Doświadczenie składało się z następujących serii: 1) pożywka bez węgla i bez fluoru, 2) bez węgla, z fluorem, 3) z węglem, bez fluoru, 4) z węglem i z fluorem. *pH* pożywki wynosiło 3,8. Doświadczenie obejmujące te same serie powtórzono z pożywką o *pH* 2,3. Wyniki zebrano w tabeli X.

Tabela X

Wpływ dodatku węgla brunatnego na toksyczność fluoru

Effect of lignite on fluorine toxicity

Nr serii — Serie N°	Wariant doświadczalny Additions to medium	Opis grzybni Description of mycellium	Sucha masa grzybni Dry weight of mycellium	
			w g in grams	w % plonu bez F per cent of yield without F
	pH pożywki 3,8 — *pH* of the medium 3,8			
1	bez węgla, no lignite bez F no F	grzybnia biała, silnie pofałdowana, liczne zarodniki	1,5035	100
2	bez węgla, no lignite z F F present	grzybnia biała, nie pokrywa całej pow. poż., brak zarodników	0,1278	8,5
3	węgiel, lignite bez F no F	grzybnia biała, silnie pofałdowana, liczne zarodniki	1,6515	100
4	węgiel, lignite z F F present	grzybnia biała, b. cienką warstwą pokrywa pożywkę, brak zarodników	0,2605	15,8
	pH pożywki 2,3 — *pH* of the medium 2,3			
5	bez węgla, no lignite bez F no F	grzybnia biała, słabo rozwinięta, brak zarodników	0,7850	100
6	bez węgla, no lignite z F F present	brak rozwoju	0	0
7	węgiel, lignite present bez F no F	grzybnia biała, silnie pofałdowana, nieliczne zarodniki	1,2783	100
8	węgiel, z F lignite and F present	brak rozwoju	0	0

5. Wpływ dodatku gleby na trujące działanie fluoru. Ponieważ w warunkach normalnych kropidlak rozwija się w glebie, w której działanie fluoru może być słabsze aniżeli w pożywce płynnej, badaliśmy wpływ dodatku gleby (0,25 g na 100 ml pożywki) na toksyczność fluoru w stężeniu 0,01-procentowym. Doświadczenie obejmowało następujące serie: 1) pożywka bez gleby i bez fluoru, 2) bez gleby, z fluorem, 3) z glebą, bez fluoru, 4) z glebą i z fluorem. *pH* pożywki wynosiło 3,8. Wyniki zamieszczono w tabeli XI.

Tabela XI

Wpływ gleby na toksyczność fluoru
Effect of soil on fluorine toxicity

Nr serii — Serie N°	Wariant doświadczalny Additions to medium	Opis grzybni Description of mycellium	Sucha masa grzybni Dry weight of mycellium	
			w g in grams	w % serii bez F per cent of serie without F
1	bez gleby, no soil bez F no fluorine	grzybnia biała, silnie pofałdowana, liczne zarodniki	1,5035	100
2	bez gleby no soil z F fluorine	grzybnia biała, nie pokrywa całej pow. poż., brak zarodników	0,1278	8,5
3	gleba, soil bez F no fluorine	grzybnia biała, silnie pofałdowana, liczne zarodniki	1,7630	100
4	gleba, soil z F fluorine	grzybnia biała, nieco silniej rozwinięta niż w 2. brak zarodników	0,2420	13,7

6. Wpływ dodatku krzemianu potasu na trujące działanie fluoru. W celu stwierdzenia, jak działają krzemiany (znane z uprzystępniania roślinom fosforu) na toksyczne działanie fluoru, założono hodowlę z dodatkiem krzemianu potasu (0,25 g krzemianu na 100 ml pożywki). Fluor użyto w stężeniu 0,01% F. Doświadczenie składało się z następujących serii: 1) pożywka bez krzemianu i bez fluoru, 2) bez krzemianu, z fluorem, 3) z krzemianem, bez fluoru, 4) z krzemianem i z fluorem. Hodowlę założono na pożywce o *pH* 4,3 oraz na pożywce o *pH* 2,3. Wyniki podaje tabela XII.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Jak to wynika z tabel I i V, fluor w postaci fluorku sodu w stężeniach do 0,0002% F nie wpłynął w warunkach naszego doświadczenia na produkcję suchej masy grzybni. Zaobserwowana w jednym wypadku zwyżka plonu grzybni (tabela I) przy stężeniu 0,00004% F nie powtórzyła się w innych doświadczeniach. Przy stężeniach wyższych od 0,0003% F plon

Tabela XII

Wpływ krzemianu potasu na toksyczność fluoru
Effect of potassium silicate on fluorine toxicity

Nr serii — Serie N°	Wariant doświadczenia Additions to medium	Opis grzybni Description of mycellium	Sucha masa grzybni Dry weight of mycellium	
			w g in grams	w % plonu bez F Per cent of yield without F
	pH pożywki 4,3 — *pH* of the medium 4,3			
1	bez Si, bez F no Si, no F	grzybnia biała, silnie pofałdowana, liczne zarodniki	1,0254	100
2	bez Si, z F no Si, F present	grzybnia biała, nie pokrywa całej pow. poż., brak zarodników	0,2130	20,8
3	z Si, bez F Si present, no F	grzybnia biała, silnie pofałdowana, liczne zarodniki	1,0202	100
4	z Si, z F Si and F present	grzybnia biała, cienką warstwą pokrywa całą pow. poż., brak zarodników	0,4031	39,5
	pH pożywki 2,3 — *pH* of the medium 2,3			
1	bez Si, bez F no Si, no F	grzybnia biała, słabo rozwinięta, brak zarodników	0,7850	100
2	bez Si, z F no Si, F present	brak rozwoju	0	0
3	z Si, bez F Si present, no F	grzybnia biała, lekko pofałdowana, nieliczne zarodniki	1,0780	100
4	z Si, z F Si and F present	grzybnia biała, cienką warstwą pokrywa pow. poż., brak zarodników	0,4540	42,1

grzybni spadał tym silniej, im stężenie fluoru w pożywce było większe. Przy koncentracjach 0,1 - 0,2% F zarodniki wprawdzie kiełkowały, ale rozwój grzybni był tak słaby, że po 5 dniach hodowli nie dało się oznaczyć suchej masy. Wytworzona grzybnia była jednak zdolna do dalszego choć bardzo powolnego rozwoju gdy pozostawiono ją w termostacie przez dłuższy czas. Stężenia 0,4% F i wyższe uniemożliwiały w ogóle kiełkowanie zarodników. Otrzymane przez nas wyniki zgodne są z obserwacjami Pirschle (1934), natomiast nie możemy potwierdzić obserwacji Ono (1900) i Richardsa (według Pirschlego, 1934), którzy stwierdzili pobudzający wpływ fluoru na kropidlaka.

Poza obniżeniem plonu grzybni toksyczne działanie fluoru zaznacza się zahamowaniem zarodnikowania. Pleśń nie była zdolna do tworzenia zarodników przy stężeniu 0,001% F i wyższych. Potwierdzają to dane Pirschle i Ono.

Toksyczność fluoru zależy od szeregu czynników, które bądź zwiększają, bądź zmniejszają jego trujące działanie. Do czynników zwiększających toksyczność tego pierwiastka należy wzrost stężenia jonów wodoro-

wych w podłożu oraz wyłączne odżywianie się grzyba azotem amonowym. W doświadczeniach, w których prowadzono hodowlę kropidlaka na pożywkach o różnym odczynie, rozwój grzybni w obecności fluoru był tym słabszy, im niższe było *pH* pożywki. Tak np. przy stężeniu 0,01% F na pożywce o *pH* 3,8 kropidlak rozwijał się dość słabo, natomiast przy tym samym stężeniu fluoru na pożywce o *pH* 2,8 zarodniki nie wykiełkowały. Z tego wynikałoby, że z trującym działaniem większych dawek fluoru na kropidlaka w warunkach naturalnych należałoby się liczyć raczej na glebach kwaśnych. W glebach takich, wykazujących silną kwasowość wymienną, mogą więc działać szkodliwie nie tylko jony manganu i glinu, ale również i fluoru.

Także wyłączne odżywianie się kropidlaka siarczanem amonu, a więc azotem w formie amonowej, zwiększa toksyczność fluoru. W doświadczeniach naszych grzybnia wyrosła na siarczanie amonowym w obecności fluoru była znacznie słabiej rozwinięta od grzybni wyrosłej na azotanie amonu.

Do czynników osłabiających trujące działanie fluoru zaliczyć należy spadek stężenia jonów wodorowych, odżywianie się wyłącznie azotem w formie azotanowej, dodatek do pożywki takich substancji, jak węgiel brunatny, gleba lub krzemian potasu.

Wyłączne odżywianie się kropidlaka azotanem sodu wpłynęło dodatnio na rozwój grzyba w obecności fluoru. Dzięki temu toksyczność tego pierwiastka na pożywce z azotanem sodu była słabsza aniżeli z azotanem amonu.

Dodatek węgla brunatnego do pożywki zawierającej fluor zmniejsza toksyczność tego składnika. I tak gdy plon grzybni pod wpływem fluoru spadał do 8,5%, to w obecności węgla dodatek fluoru obniża go tylko do 15,8%, zatem w obecności węgla brunatnego rozwój grzyba był dwukrotnie lepszy. Wpływ węgla nie był jednak na tyle silny, aby umożliwić kiełkowanie zarodników przy niższym odczynie. Doświadczenie z węglem brunatnym potwierdza nasze dawniejsze obserwacje nad antytoksycznym działaniem węgla (Lityński i Jurkowska 1952). Być może działanie węgla polega na jego dużych zdolnościach sorpcyjnych, dzięki którym usuwa on częściowo fluor z pożywki, zmniejszając w ten sposób jego trujący wpływ.

Podobnie do węgla brunatnego działa dodatek gleby. I tak podczas gdy fluor w stężeniu 0,01% obniżył plon suchej masy grzybni do 8,5%, to w obecności 0,25 g gleby w 100 ml pożywki obniżka plonu była mniejsza, plon grzyba w serii z fluorem wynosił bowiem 13,7% plonu bez fluoru. Osłabienie trującego działania fluoru przez glebę jest zapewne wynikiem wielu czynników, jak zdolności sorpcyjnych gleby, obecności w niej jonów wapnia, krzemionki itp.

Również krzemian potasu należy do tych substancji, które mogą osłabiać toksyczne działanie fluoru. I tak podczas gdy bez krzemionki toksyczność fluoru stosowanego w stężeniu 0,01% wyrażała się spadkiem plonu do 20,8%, to w obecności krzemionki plon spadał tylko do 39,8%, innymi słowy rozwój grzyba był dwukrotnie lepszy. O silnym wpływie krzemionki świadczy też fakt, że przy *pH* 2,3, przy którym stężenie 0,01% F uniemożliwiało rozwój grzyba w ogóle, przy dodatku krzemianu potasu grzybnia rozwijała się, a spadek plonu w porównaniu do serii z krzemionką bez fluoru wyrażał się liczbą 42,1%.

Z doświadczeń nad warunkami toksyczności fluoru sądzić należy, że w warunkach naturalnych, a więc w glebie, trujące działanie fluoru prawdopodobnie nigdy nie jest tak silne jak w warunkach sztucznych w płynnej pożywce, ponieważ osłabia go szereg czynników (materia organiczna, krzemionka, kationy wiążące fluor, jak np. jony wapnia itp.). Zwłaszcza gleby cięższe o odczynie obojętnym nie ujawnią ujemnego działania fluoru. Temu zapewne należy przypisać brak dowodów świadczących o toksycznym wpływie fluoru zawartego w nawozach fosforowych doprowadzanych do gleby (Bredemann i Radeloff, Brioux, według Bredemanna, 1951). W wypadkach, w których stwierdzono małą efektywność nawozów fosforowych zawierających fluor, przypisać to należy być może nie tyle bezpośrednio ujemnemu działaniu fluoru na rośliny, ile zmniejszeniu przyswajalności fosforu z tych nawozów. Jedynie wówczas, kiedy przy siewie rzędowym mieszamy superfosfat granulowany z nasionami na pewien czas przed siewem, można obawiać się bezpośrednio ujemnego wpływu fluoru. Nie jest rzeczą wykluczoną, że toksyczność fluoru jest drugim. obok wysuwanej przez Motkina (1951) kwasoty superfosfatu, czynnikiem wpływającym szkodliwie na kiełkowanie niektórych nasion po wcześniejszym ich zmieszaniu z superfosfatem. Niejednakowa odporność nasion różnych roślin na fluor może być, obok różnej ich odporności na kwasotę, przyczyną obniżania przez superfosfat zdolności kiełkowania niektórych nasion.

Ilość fosforu w pożywce nie ma wpływu na toksyczność fluoru. Trzeba tu jednak podkreślić, że zjawisko to obserwowano w hodowli na pożywce nie zawierającej wapnia. Być może w glebie, w której na skutek obecności wapnia mogą tworzyć się nierozpuszczalne połączenia fosforowe typu fluoroapatytu, ilość fosforu w podłożu może wpływać na trujące działanie tego pierwiastka.

Tablica VI

Do pracy: Lityński, Jurkowska i Pieniak, str. 147.

Fot. 1. Wpływ wzrastających dawek fluoru na rozwój kropidlaka. Procentowa zawartość fluoru: *1* — 0; *2* — 0,00004; *3* — 0,0002; *4* — 0,001; *5* — 0,005; *6* —0,01; *7* — 0,05; *8* — 0,2; *9* — 0,4.

Fot. 2. Wpływ źródła azotu na toksyczność fluoru: *1* — NH_4NO_3, bez fluoru; *2* — NH_4NO_3, 0,01% F; *3* — $NaNO_3$, bez fluoru; *4* — $NaNO_3$, 0,01% F; *5* — $(NH_4)_2SO_4$, bez fluoru; *6* — $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% F.

Fot. 3 i 4. Wpływ odczynu na toksyczność fluoru. Fot. 3 — z 0,01% F. *1* — 1,6 *pH*; *2* — 2,3 *pH*; *3* — 2,8 *pH*; *4* — 4,3 *pH*; *5* — 5,2 *pH*; *6* — 5,8 *pH*; *7* — 6,5 *pH* Fot. 4 — bez fluoru.

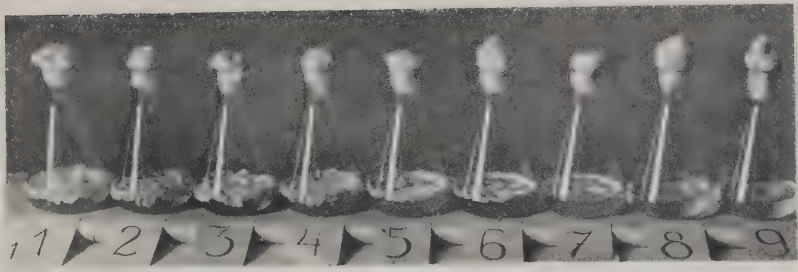
Table VI

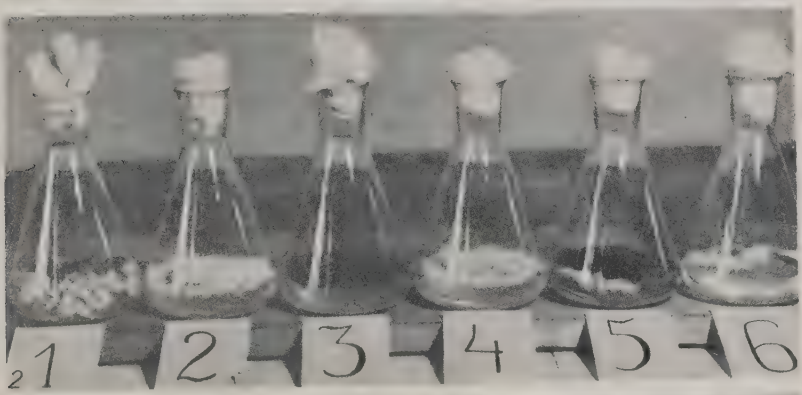
To the paper of Lityński, Jurkowska and Pieniak, p. 147.

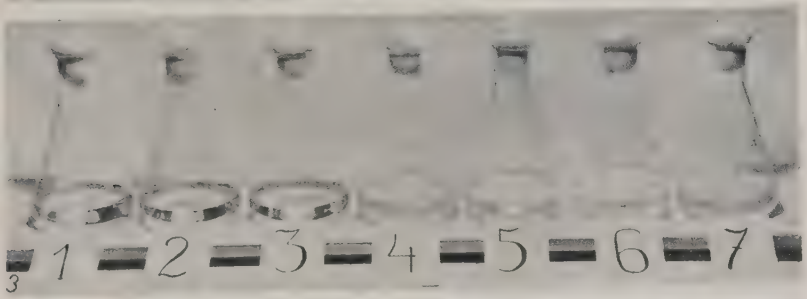
Phot. 1. The effect of fluorine on the growth of *A. niger*. Ciphers denote concentration of F in %: *1* — 0; *2* — 0,00004; *3* — 0,0002; *4* — 0,001; *5* — 0,005; *6* — 0,01; *7* — 0,05; *8* — 0,2; *9* — 0,4.

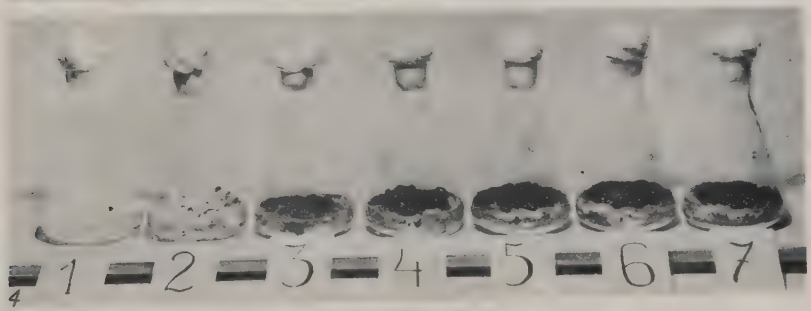
Phot. 2. The influence of the kind of nitrogen source upon the toxicity of fluorine: *1* — NH_4NO_3, no F; *2* — NH_4NO_3, 0,01% F; *3* — $NaNO_3$, no F, *4* — $NaNO_3$, 0,01% F: *5* — $(NH_4)_2SO_4$, no F; *6* — $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% F

Phot. 3. and 4. The effect of *pH* upon the toxicity of fluorine. *pH*: *1* — 1,6; *2* — 2,3; *3* — 2,8; *4* — 4,3; *5* — 5,2; *6* — 5,8; *7* — 6,5; phot. 3 — 0,01% F; phot. 4 — no fluorine


1
1 2 3 4 5 6 7 8 9


2
1 2 3 4 5 6


3
1 2 3 4 5 6 7


4
1 2 3 4 5 6 7

Wpływ fluoru zaznacza się wyraźnie na pobieraniu składników pokarmowych i ich przeróbce. I tak zużycie cukru (w odniesieniu do 1 g wytworzonej grzybni) przy dawkach toksycznych jest większe w obecności fluoru, przy czym im dawka fluoru wyższa, a więc silniej toksyczna, tym zużycie cukru wyższe. Tak np. przy dawce 0,05% F ilość cukru zużyta na wyprodukowanie 1 g suchej masy grzybni wynosiła przeszło dwa razy więcej aniżeli w serii bez fluoru (tabela II).

Jak to widać z tabeli III, w miarę wzrostu stężenia fluoru w pożywce zmniejsza się procentowa zawartość fosforu w grzybni. W obecności fluoru pleśń pobiera więc mniejsze ilości fosforu. Zjawisko gorszego wykorzystania przez rośliny wyższe fosforu z nawozów fosforowych w obecności fluoru jest znane i tłumaczone wytwarzaniem się nierozpuszczalnych, a więc trudno dostępnych dla roślin związków fosforowych typu apatytowego. Według Mitchella i Edmana (1952) pobieranie fosforu z nawozów fosforowych stoi w odwrotnej korelacji do zawartości fluoru. Według Gericke (cyt. za Bredemannem 1951) fluoroapatyt jest bardzo trudno rozpuszczalny i niedostępny dla roślin. Im większy jest udział fluoroapatytu $Ca_{10}F_2(PO_4)_6$, tym słabszą wartość nawozową posiada fosforyt. Dlatego dla otrzymania wartościowych nawozów fosforowych rozbija się drobinę fluoroapatytu i usuwa z niej fluor, aby nie dopuścić do tworzenia się w glebie tego trudno przyswajalnego połączenia fosforowego. Dodając do wyciągów uzyskanych z różnych nawozów fosforowych rozpuszczalne fluorki, Scharrer, Gericke i Jung (1953) oraz Koch (1953) stwierdzili zmniejszanie się rozpuszczalności fosforu na skutek tworzenia się związków typu fluoroapatytowego. Jung (1953) w doświadczeniach wazonowych z owsem stwierdził słabsze pobieranie fosforu z fosforanu dwuwapniowego pod wpływem fluoru. To ujemne działanie miało jedynie miejsce wówczas, gdy nawóz fosforowy mieszany był z rozpuszczalnymi fluorkami, natomiast przy oddzielnym wysiewie fluorków i nawozów fosforowych działania tego nie było.

Doświadczenia nasze rzucają jednak nowe światło na rolę fluoru w gospodarce fosforowej rośliny. Do wytworzenia związków fluoroapatytowych konieczna jest bowiem obecność wapnia, którego w pożywce nie było. Okazuje się więc, że fluor utrudnia pobieranie fosforu nie tylko na drodze pośredniej, przeprowadzając fosforany w związki trudno dla roślin dostępne, ale i na drodze bezpośredniej. Nawet zwiększone ilości fosforu nie polepszają rozwoju pleśni.

Jeżeli z kolei zwrócimy uwagę na udział poszczególnych kategorii związków fosforowych, składających się na całkowity fosfor zawarty w grzybni, to przekonamy się, że niezależnie od dawki fluoru ogromna część fosforu, a mianowicie około 75% fosforu całkowitego, znajduje się w formie mineralnej. Resztę (około 25%) stanowią różne organiczne połączenia fosforowe. Z tego wynikałoby, że fluor nie wpływa na stosunek fosforu mineralnego do fosforu organicznego, a zatem nie utrudnia przeróbki fosforu mineralnego na organiczne związki fosforowe. Jakkolwiek stosunek ten jest mniej więcej stały, zmienia się skład fosforu organicznego. I tak, gdy w grzybni wyrosłej na pożywce bezfluorowej fosfor nukleinowy (łącznie z lipoidowym) przeważał nad fosforem organicznym rozpuszczalnym w kwasach, to w obecności fluoru przeciwnie, istnieje przewaga fosforu organicznego rozpuszczalnego. Należałoby wyjaśnić, czy jest to następstwem utrudnionej syntezy związków nukleinowych

pod wpływem fluoru, czy też chodzi tu o wzmożoną syntezę rozpuszczalnych połączeń organicznych, głównie związków heksozofosforowych, potrzebnych organizmowi przy wzmożonym oddychaniu, wywołanym zatruciem fluorem (B o r e i 1940). Wiadomo bowiem, że związki heksozofosforowe stanowią jeden z etapów w procesie spalania cukrów.

Jeżeli chodzi o gospodarkę azotową kropidlaka, to stwierdzić można wpływ fluoru zarówno na ilość pobieranego azotu jak i na formę, w której pleśń pobiera ten składnik pokarmowy. I tak im więcej fluoru w pożywce, tym procentowa zawartość azotu w grzybni jest wyższa, czyli grzyb pobiera więcej azotu. Na przykład, gdy w pożywce bezfluorowej zawartość azotu w grzybni wynosiła 3,36%, to w pożywce o stężeniu 0,05% F wynosiła aż 10,88% N. Fluor wpływa również na formę, w jakiej grzyb pobiera azot. W pożywce normalnej, bez fluoru, można stwierdzić przewagę zużycia azotu amonowego nad azotanowym. Zjawisko to jest znane w literaturze i wykazane między innymi przez V o r b r o d t a (1919) w obszernej pracy o przeróbce azotu w grzybni kropidlaka. Jest to zrozumiałe z tego względu, że pobierając azot amonowy grzyb szybciej może wytwarzać substancje białkowe, w których azot znajduje się też w formie zredukowanej. Tak więc normalnie mając do wyboru azot amonowy i azotanowy kropidlak wybiera azot amonowy. Natomiast pod wpływem fluoru selekcja ta odwraca się i pobieranie azotu azotanowego zaczyna przeważać nad pobieraniem azotu amonowego. Tak np. gdy w pożywce bezfluorowej stosunek pobranego azotu amonowego do azotanowego wynosił 2,13, w obecności fluoru w stężeniu 0,01% wynosił tylko 0,81. Znajduje to potwierdzenie i w tych doświadczeniach, w których prowadzono hodowlę kropidlaka na różnych źródłach azotu, a mianowicie na azotanie amonu, azotanie sodu i na siarczanie amonu. W obecności fluoru pleśń rozwijała się najlepiej tam, gdzie azot znajdował się w formie azotanowej, najgorzej zaś na siarczanie amonu. Byłoby rzeczą ciekawą wyjaśnienie tego zjawiska, które może polegać np. na tym, że albo grzyb, mając pod wpływem fluoru uszkodzony aparat enzymatyczny potrzebny do przeróbki azotu amonowego na organiczne związki azotowe, ogranicza jego pobieranie, zabezpieczając się w ten sposób przed zbytnim nagromadzeniem amoniaku w komórce, co działałoby na plazmę trująco (jak wiadomo nagromadzenie w komórce pewnej ilości azotanów nie jest szkodliwe), albo chodzi tu o fizjologiczny odczyn połączeń azotowych, gdyż jak wykazaliśmy, toksyczne działanie fluoru w środowisku mniej kwaśnym jest słabsze i dlatego być może obecność w pożywce azotanu sodu jako soli fizjologicznie zasadowej bardziej sprzyja rozwojowi grzybni, niż obecność fizjologicznie kwaśnego siarczanu amonu.

Wyniki pracy dadzą się streścić w następujących punktach:

1) brak stymulującego działania małych dawek fluoru,

2) toksyczne działanie większych dawek,

3) zahamowanie zarodnikowania pod wpływem większych dawek fluoru,

4) zależność toksyczności od różnych czynników: a) toksyczność wzmagają — wzrost stężenia jonów wodorowych w pożywce, wyłączne odżywianie azotem amonowym, b) toksyczność osłabiają — spadek stężenia jonów wodorowych w pożywce, wyłączne odżywianie azotem azo-

tanowym, obecność w pożywce węgla brunatnego, gleby lub krzemianu potasu,

5) wpływ fluoru na intensywność pobierania składników pokarmowych: a) wzrost zużycia cukru w przeliczeniu na jednostkę wytworzonej masy grzybni, b) wzrost pobierania azotu (przy czym pod wpływem fluoru następuje przestawienie w pobieraniu z postaci amonowej na azotanową), c) zmniejszenie pobierania fosforu,

6) wpływ fluoru na gospodarkę fosforową, który zaznacza się zmniejszeniem produkcji związków nukleinowych kosztem wzrostu syntezy połączeń heksozofosforowych.

LITERATURA

1. Borei H., 1940: Über die Einwirkung von Fluorid auf Cytochrom und Cytochrom-oxidase, *Chem. Z.*, **1**: 3936.
2. Bredemann G., 1951: Biochemie und Physiologie des Fluors, Akad. Verlag, Berlin.
3. Jung W., 1953: Pflanzenphysiologische Untersuchungen über die Einwirkung von Fluor auf Phosphate, *Phosphorsaure*, **13**: 101.
4. Koch F. J., 1953: Zur Wirkung des Fluors auf die Löslichkeit der Phosphorsäure im Thomasphosphat, *Z. Pfl. D. u. Bodenkunde*, **60**: 282.
5. Koehler Z., 1926: Sur les composés phosphorés des plantes. *Bull. Acad. Pol. Sci, LI, Ser. B*,: 707.
6. Lityński T. i Jurkowska H., 1952: Wartość nawozowa krajowego węgla brunatnego, cz. I., *Przemysł Chem.*, **31**: 13.
7. Mitchell H. H. a. Edman M., 1952: Fluorine in soils, plants and animals, ref. w *Bod. u. Pfl.*, **58**: 186.
8. Motkin W. M., 1951: Wpływ nawozów granulowanych na kiełkowanie przy wysiewie razem z ziarnem. *Sowiet. Agron.*, **9**: 29.
9. Ono N., 1900: Über die Wachstumbeschleunigung einiger Algen und Pilze durch chemische Reize, *J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokio* (Japan), **13**: 141.
10. Pirschle K., 1934: Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit *Aspergillus niger*, *Planta*, **23**: 197.
11. Przyłęcki S. i Grynberg, 1932, *Biochem. Z.*, **248**: 16.
12. Scharrer K., Gericke S. u. Jung W., 1953: Untersuchungen über das Verhalten einiger Phosphate gegenüber der Einwirkung von Fluoriden in wässriger Lösung, *Z. Pfl. D. u. Bodenkunde*, **60**: 250.
13. Wolf F. A. a. Wolf F. T., 1947: The Fungi, t. I., John Wiley & Sons Inc., New York.
14. Vorbrodt W., 1919: O przeróbce azotu i fosforu w grzybni kropidlaka (*Aspergillus niger*), *Rozprawy PAU*, **59**: 223.

T. Lityński, H. Jurkowska and *D. Pieniak*

INFLUENCE OF FLUORINE UPON *ASPERGILLUS NIGER*

Summary

A. niger was grown in Pfeffer's medium containing sodium fluoride in various concentrations.

Fluorine in concentrations higher than 0.0006% F inhibited growth and sporulation of the fungus.

The toxic effect of fluorine ion was stronger in media with higher hydrogen ion concentration and when the only available source of nitrogen for the fungus was in form of ammonium ion.

It was shown that low *pH*-ion concentration, presence of lignite, soil, potassium silicate, of nitrate ion as only available nitrogen source, resulted in weakening of antifungal action of fluorine.

In presence of fluorine *A. niger* assimilated less phosphorus. This effect was due not to formation of insoluble phosphorus compounds but to direct influence of fluorine upon the metabolism of microorganism.

The ratio of mineral to organic compounds of phosphorus in mycellium was unchanged. In the presence of fluorine the amount of acid-soluble phosphorus was greater than the amount of nucleic acids phosphorus.

Fluorine stimulated nitrogen assimilation. In its presence the nitrates were more accesible than ammonium.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 156—171

B. Smyk i *A. Miłkowska*

WPŁYW NAWOŻENIA MINERALNEGO W POŁĄCZENIU Z KOSZARZENIEM NA ZESPOŁY MIKROFLORY GLEB PASTWISK GÓRSKICH

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej WSR w Krakowie

Jednym z podstawowych problemów nowoczesnej gospodarki górskiej jest podniesienie plonowania użytków halnych drogą zastosowania właściwych zabiegów agrotechnicznych, w oparciu o dokładną znajomość środowiska. Zagadnienie racjonalnego nawożenia gleb pastwisk górskich ma duże znaczenie gospodarcze dla zwiększenia bazy paszowej.

Kiełpiński (1952), doceniając ważność powyższego zagadnienia, zainicjował badania zespołowe nad wpływem nawożenia mineralnego w połączeniu z koszarzeniem na plonowanie użytków halnych. Kompleksowość tego zagadnienia wymaga szerokiego zakresu badań — obejmujących własności fizyczne, chemiczne, fitosocjologiczne, agrotechniczne i dynamikę mikrobiologiczną tych gleb. Starano się w oparciu o wyniki badań zespołowych wykazać, który ze sposobów nawożenia mineralno-organicznego wpływa korzystnie zarówno na aktywność mikrobiologiczną gleb, jak i na ich plonowanie.

Badania tego typu, aczkolwiek tylko orientacyjne, przeprowadzone przez badaczy szwajcarskich (Stöckli 1944, Düggeli 1943) wykazały nie tylko słuszność i racjonalność, ale i ich konieczność przy tego rodzaju pracach badawczych. Również liczne materiały zebrane przez Miszustina (1950) wskazują, że bakterie są najlepszym wskaźnikiem charakteryzującym gleby.

Zgodnie z założeniem roboczym niniejszej pracy, mającej na celu wykazanie wpływu odpowiedniego nawożenia mineralnego w połączeniu z koszarzeniem na aktywność biologiczną gleb pastwisk górskich, wykonano następujące badania mikrobiologiczne:

1. Oznaczenie ogólnej ilości drobnoustrojów: a) bakterii w postaci wegetatywnej, b) bakterii w postaci spoczynkowej, c) promieniowców i d) grzybów.
2. Oznaczenie ilości amonifikatorów.
3. Oznaczenie ilości nitryfikatorów.
4. Oznaczenie ilości denitryfikatorów.
5. Oznaczenie asymilatorów wolnego azotu: a) ilości azotobaktera, b) ilości (miano) beztlenowych asymilatorów azotu, c) ilości (miano) bakterii brodawkowych (*Rhizobium*).

Tabela I

Wpływ nawożenia na aktywność mikrobiologiczną gleb pastwisk górskich
Influence of the fertilizers upon the microbiol

Data pobrania próbek Date of sample collection	Rodzaj nawożenia i symbol poletka Kind of fertilizers and sign of experiment field	*pH* gleby — *pH* of soil	Ilość drobnoustrojów w Number of microorganisms			
			Ogólna ilość drobnoustrojów Total			
			Bakterie czynne Vegetative forms	Przetrwalniki Spores	Promieniowce Actinomycetes	Grzyby Fungi
13.7. 1953	I. Kontrolne (1a, 15a, 28a)	6,30	538	108	8,5	12,5
	II. NPK (2g, 16g, 27g)	6,40	1100	82	55	16,0
	III. Koszar dobowy 1 m²/owcę (5b, 20b, 24b)	6,30	3176	64	36	16,5
	IV. Koszar nocny 2 m²/owcę + NPK (6e, 9e, 19e)	6,35	2460	86	47	15,8
19.6. 1954	I. Kontrolne (1a, 15a, 28a)	6,30	638	98	10	8,4
	II. NPK (2g, 16g, 27g)	6,70	4850	77	212	2,1
	III. Koszar dobowy 1 m²/owcę (5b, 20b, 24b)	6,40	6200	12,4	292	8,6
	IV. Koszar nocny 2 m²/owcę + NPK (6e, 9e, 19e)	6,60	7500	37,5	258	5,6
4.7. 1955	I. Kontrolne (1a, 15a, 28a)	6,00	398	32	2,8	3
	II. NPK (2g, 16g, 27g)	6,20	4940	24	1,2	7
	III. Koszar dobowy 1 m²/owcę (5b, 20b, 24b)	6,20	6840	36	40	9
	IV. Koszar nocny 2 m²/owcę + NPK (6e, 9e, 19e)	6,40	8280	43	72	2

I — Control, II — NPK, III — 24 hours animal enclosure, 1 m² per sheep, IV — night animal

Rok doświadcz. 1953 - 1954 - 1955. Rejon doświadczalny II (Cerkiel nr 16)
ogical activity of soil of mountain pastures

1 g gleby (w tysiącach) per 1 g of soil (in thousands)						
Amonifikatory Ammonificators	Nitryfikatory Nitrifying bacteria	Denitryfikatory Denitrifying bacteria	Asymilatory wolnego azotu Nitrogen fixing bacteria			Rozkład błonnika Cellulose decomposition
			Azotobakter *Azotobacter*	Beztlenowe (miano) Anaerobic (titer)	*Rhizobium* (miano) *Rhizobium* (titer)	
0,9	0	0	0	0	0	+
5,5	0,218	0,356	0,010	0,10	0	+
14,4	0,920	0,180	0,008	0,01	0	+
18,8	1,642	0,224	0,012	0,01	0	+
4,2	0,018	0,005	0,001	0,1	0,1	+
8,4	0,386	0,980	0,920	0,01	0,001	++
20,2	4,020	0,540	0,610	0,001	0,010	+++
31	3,860	0,610	1,284	0,010	0,001	+++
2,3	0,008	0,001	0	0	0	+
2,4	0,100	0,400	0,220	0,010	0,010	++
16,0	0,640	0,150	0,200	0,001	0,010	++
16,8	2,200	0,280	0,560	0,010	0,010	+++

enclosure — 2 m² per sheep. + N P K

Tabela II

Wpływ nawożenia na aktywność mikrobiologiczną gleb pastwisk górskich
Influence of the fertilizers upon the microbiol

Data pobrania próbek Date of sample collection	Rodzaj nawożenia i symbol poletka Kind of fertilizers and sign of experiment field	*pH* gleby — pH of soil	Ilość drobnoustrojów w Number of microorganisms			
			Ogólna ilość drobnoustrojów Total			
			Bakterie czynne Vegetative forms	Przetrwalniki Spores	Promieniowce Actinomycetes	Grzyby Fungi
13.7. 1953	I. Kontrolne (1a, 10a, 15a)	6,00	450	124	19	29
	II. NPK (2e, 9e, 20e)	6,40	1445	105	84	24
	III. Koszar dobowy 1 m²/owcę (8b, 14b, 18b)	6,40	1416	84	47	21
	IV. Koszar nocny 2 m²/owcę+ NPK (3d, 7d, 13d)	6,55	1912	102	72	12
19.6. 1954	I. Kontrolne (1a, 10a, 15a)	6,30	643	167	22	21
	II. NPK (2e, 9e, 20e)	6,50	5400	94	380	12
	III. Koszar dobowy 1 m²/owcę (8b, 14b, 18b)	6,60	8000	44	510	23
	IV. Koszar nocny + NPK (3d, 7d, 13d)	6,60	17600	55	400	5
4.7. 1955	I. Kontrolne (1a, 10a, 15a)	6,10	163	47	4	1,2
	II. NPK (2e, 9e, 20e)	6,30	7225	90	6	1,5
	III. Koszar dobowy 1 m²/owcę (8b, 14b, 18b)	6,30	8530	299	17	1,6
	IV. Koszar nocny + NPK (3d, 7d, 13d)	6,50	16810	389	28	6

I — Control, II — NPK, III — 24 hours animal enclosure, 1 m² per sheep, IV — night animal

Rok doświadcz. 1953 - 1954 - 1955. Rejon doświadczalny I (Bukowinki)
ogical activity of soil of mountain pastures

1 g gleby (w tysiącach)
per 1 g of soil (in thousands)

Amonifikatory Ammonificators	Nitryfikatory Nitrifying bacteria	Denitryfikatory Denitrifying bacteria	Asymilatory wolnego azotu Nitrogen fixing bacteria			Rozkład błonnika Cellulose decomposition
			Azotobakter *Azotobacter*	Beztlenowe (miano) Anaerobic (titer)	*Rhizobium* (miano) *Rhizobium* (titer)	
1,2	0	0	0	0	0	0
6,8	0,224	0,424	0,028	0,010	0	+
20,2	1,840	0,220	0,010	0,010	0	+
21,5	1,700	0,300	0,017	0,010	0,10	+
0,6	0,003	0,004	0,002	0,100	0	+
10,2	0,264	0,720	0,810	0,001	0,001	++
26,6	3,720	0,320	0,700	0,001	0,010	+++
28,4	3 600	0,360	1,040	0,001	0,001	+++
1,0	0,005	0,001	0	0	0	+
4,0	0,150	0,480	0,140	0,010	0,010	+
17,5	0,140	0,100	0,080	0,001	0,010	+++
24,2	2,150	0,740	0,300	0,001	0,010	++

enclosure — 2 m² per sheep + NPK

6. Oznaczenie energii rozkładu błonnika.

7. Określenie stopnia współzależności między stanem aktywności mikrobiologicznej a ilością i jakością plonu w odpowiednich kombinacjach nawożenia.

Badania związane z tematem niniejszej pracy przeprowadzono w latach 1953, 1954 i 1955 na parcelach doświadczalnych PAN (obecnie IMUZ) Stacji Zagospodarowania Pastwisk Górskich w Jaworkach k. Szczawnicy, a określonych jako: a) rejon doświadczalny I (Bukowinki) (wys. 850 m n.p.m.), b) rejon doświadczalny II (Cerkiel Nr 16) (wys. 900 m n.p.m.), c) rejon doświadczalny III (Trójka) (wys. 950 m n.p.m.).

Rejon nr 3 charakteryzuje się typowym naturalnym zespołem roślinnym *N-Nardetum*. Gleba rędzina. W badanych okresach suma rocznych opadów wynosiła: w r. 1953 — 858,4 mm, w r. 1954 — 946,2 mm, w r. 1955 — 1540,6 mm. W pracy niniejszej uwzględniono również rozkład opadów i wahania wilgotności gleby w badanych okresach wegetacyjnych.

Badania mikrobiologiczne wykonano w następujących kombinacjach nawożenia:

I — kontrolne,

II — nawożenie mineralne: NPK (P_2O_5 — 60 kg, K_2O — 80 kg, N — 50 kg) *,

III — koszar dobowy, 1 m^2 na owcę,

IV — koszar nocny, 2 m^2 na owcę + NPK (P_2O_5 — 50 kg, K_2O — 60 kg, N — 60 kg).

Wyniki (wycinkowe tylko z okresu letniego) z wykonanych badań mikrobiologicznych zebrałem w tabelach I i II.

Na podstawie uzyskanych wyników można powiedzieć, że korzystne rezultaty (w porównaniu z kontrolą) uzyskano w IV i III kombinacjach nawożenia.

W tych kombinacjach nawożenia stwierdzono wybitny wzrost ogólnej ilości drobnoustrojów, a w szczególności: amonifikatorów, nitryfikatorów, azotobaktera oraz energii rozkładu błonnika. Duży wzrost ogólnej ilości drobnoustrojów w badanych glebach wskazywałby na to, że gleby te są obecnie w wysokim stopniu aktywne biologicznie.

W kombinacji II (nawożenie mineralne NPK) zaobserwowano również duży wzrost ogólnej ilości drobnoustrojów, a w szczególności stosunkowo liczne występowanie bakterii brodawkowych.

Oceniając ogólnie otrzymane wyniki można by sądzić, że stosowane nawożenie (kombinacja IV, III i II) wywiera korzystny wpływ na aktywność biologiczną gleb. Fizykochemiczna struktura gleb ulega znacznej poprawie. Stwierdzono też wybitną zwyżkę plonów i zmiany w składzie botanicznym porostu (Kiełpiński 1955). Mianowicie zaobserwowano gwałtowną recesję bliźniczki wyprostowanej (*Nardus stricta*) przy równoczesnym wzroście udziału traw słodkich. Omówione metody nawożenia mineralno-organicznego, wywierające swoisty wpływ na zmianę układu stosunków biocenotycznych w naturalnych zespołach roślinnych — jakimi są bliźniczyska (*Nardetum*) — są korzystne z punktu widzenia agrotechnicznego.

---

* Dawki nawozów podano w kg w przeliczeniu na 1 ha.

LITERATURA

1. Düggeli M., 1943: Der Einfluss eines Düngungsversuches in Nante bei Airolo auf die Bakterienflora des Bodens. *Berichte Schweiz. Botan. Gesellsch.*, **53**, A:
2. Kiełpiński J., 1952: Baza paszowa w górach w świetle nowszych badań. *Post. Wiedzy Roln.*, Nr 4.
3. Kiełpiński J., 1955: Nowe kierunki w agrotechnice łąk i pastwisk górskich, *Gospodarka Wodna*, Nr 8.
4. Stöckli A., 1944: Die Verbreitung der Azotobacterorganismen in der Schweiz. *Landwirtschaftl. Jahrb. Schweiz.*, **58**.

B. Smyk and *A. Miłkowska*

THE INFLUENCE OF MINERAL FERTILIZERS CONNECTED WITH THE ENCLOSURE OF ANIMALS UPON ASSOCIATIONS OF SOIL-MICROFLORA OF MOUNTAIN PASTURES

Summary

Authors have carried during a three year period the group research on the influence of mineral fertilizers and the enclosure of animals upon associations of soil microflora of mountain pastures.

There were studied: a) general amount of microorganisms (bacteria in vegetative form, spores, actinomycetes and fungi), b) the amount of ammonificators c) the amount of nitrificators, d) the amount of denitrificators, e) the amount of bacteria assimilating free nitrogen, f) the energy of cellulose decomposition.

The research was carried in 1953, 1954, 1955 in the Experimental Station of the Polish Academy of Science (now the Institute of Melioration and Grassland) in Jaworki near Szczawnica, in the following combinations of manuring: I. — Control (no manuring), II. — Mineral fertilizing NPK, III. — 24 hours enclosure, 1 m^2 per sheep, IV. — Night enclosure, 2 m^2 per sheep, + NPK.

The natural association *N-Nardetum* is characteristic for the above mentioned area.

Good results were obtained in the following combinations:

a) night enclosure, 2 m^2 per sheep, + NPK (IV),

b) 24 hrs enclosure, 1 m^2 per sheep (III).

Remarcable increase in the general amount of microorganisms was observed, specially of the ammonificators, nitrificators, *Azotobacter* and cellulose decomposing bacteria.

The fertilizers used (IV and III and partly II) have a good influence on the microbiological activity of the soil. An increase of crop, change in the botanical composition of the grassland (the recession of *Nardus stricta* and simultaneous growth of sweet grasses) was observed. The methods of manuring given above are advantageous from the agrotechnical point of view.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 173—180

J. Paluch, S. Radecka, M. Zdybiewska i *J. Filipowicz*

CHARAKTERYSTYKA MIKROBIOLOGICZNA WODY ZBIORNIKA RZECZNEGO W KOZŁOWEJ GÓRZE PRZEZNACZONEGO DLA CELÓW WODOCIĄGOWYCH

Z Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych i Katedry Technologii Wody i Ścieków Politechniki Śląskiej w Gliwicach

W poprzedniej pracy (P a l u c h *et al* 1955) przedstawiono wyniki badań stanu bakteriologicznego wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze za okres 1952 i 1953 roku. Obecnie podano częściowe wyniki obszerniejszych badań, obejmujących rok 1954.

W poprzednich i obecnych badaniach określano stopień zanieczyszczenia i możliwość zakażenia wody za pomocą oznaczeń miana *coli* oraz ogólnej ilości bakterii saprofitycznych, posiadających optimum temperatury rozwoju w granicach 20 - 22°, i bakterii o optimum temperatury rozwoju w około 37°. Wprawdzie wiadomo, że tego rodzaju badanie nie daje całkowitego obrazu bezwzględnej ilości bakterii bytujących w wodzie, jednak wskazuje na możliwość zanieczyszczenia i istniejące zanieczyszczenie wody substancjami pochodzenia ściekowego. W celu określenia sanitarnego stanu wody badanie takie przyjęto za wystarczające, szczególnie gdy prowadzi się je stale.

METODYKA PRACY

Badania polegały na stałym, prawie co dwutygodniowym pobieraniu próbek wody, przy czym zależnie od stanu wody pobierano je z głębokości 30, 100, 200, 300 i więcej cm. W ciągu 1954 r. pobrano ogółem 25 razy ponad 400 próbek, każda w dwóch powtórzeniach. Oprócz badań stałych, prowadzonych na stanowiskach I, IX, X i XIII, przeprowadzano raz na miesiąc badania okresowe na terenie całego zbiornika i jego otoczenia na stanowiskach podanych na rysunku 1.

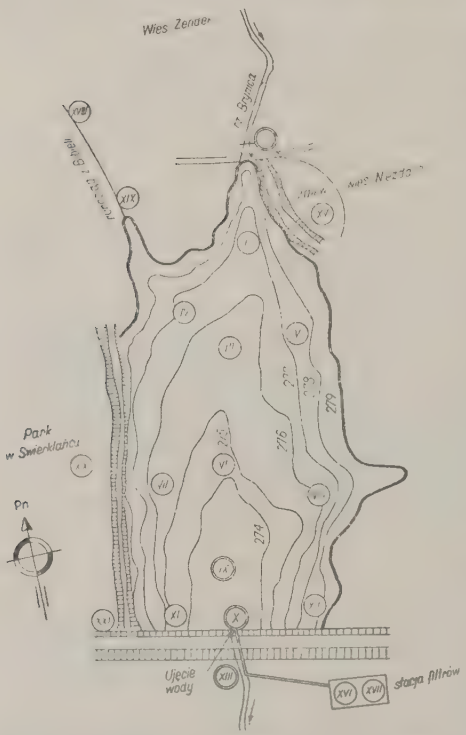
Próbki wody pobierano do jałowych butelek o pojemności 50 ml, z korkami szlifowanymi, umieszczonych w batometrze umożliwiającym otwieranie i zamykanie butelek na dowolnej głębokości. Próbki wysiewano po upływie 4 - 2 godzin po pobraniu, nie rozcieńczane i w rozcieńczeniu 1 : 10 i 1 : 100. Określano ilości kolonii wyrastających na agarze mięsno-peptonowym po 24 godzinach w temp. 37° ± 1° i na żelatynie mięsno-peptonowej po 48 godzinach w temp. 20° ± 1°. Wyniki przeliczano na zawartość bakterii w 1 ml badanej wody. Określano też miano i typ pałeczki okrężnicy. Oznaczenia wykonywano według metodyki Państwowego Zakładu Higieny. Dodatkowo stosowano też obliczenia ilości kolonii wyrastających na agarze mięsno-peptonowym w temp. 27° ± 1° po 96 godzinach, gdyż jak się przekonano tego rodzaju próby dają lepszy wskaźnik ilości bakterii w wodzie.

Poprzednie badania wykazały, że w zbiorniku w Kozłowej Górze znajduje się duża ilość bakterii proteolitycznych powodujących upłynnienie żelatyny. Uniemożliwiało to w dużej ilości przypadków odczytanie wyników posiewów na żelatynie. Z tego powodu w 1954 r. położono większy nacisk na to zagadnienie i poza nor-

malnymi posiewami niektóre kolonie wyrastające na żelatynie przeszczepiano i identyfikowano według przyjętej metodyki badań bakteriologicznych. Identyfikowano tylko kolonie otrzymane ze stanowisk I i IX. Dla uzupełnienia całości badań identyfikowano także niektóre kolonie pochodzące z tych samych stanowisk, a wyosobnione na agarze.

CHARAKTERYSTYKA MIKROBIOLOGICZNA ZBIORNIKA W 1954 ROKU

Podobnie jak w latach poprzednich starano się próbki pobierać regularnie, toteż nie zawsze pobierano je przy ustalonej pogodzie. Kilkakrotnie pobierano próbki w czasie deszczu, śniegu lub większego zachmurzenia, co oczywiście wpłynęło na otrzymane wyniki. Nie udało się dokładnie określić stopnia tego wpływu, gdyż próby określania zmian ilości bakterii w czasie np. trzydniowego deszczu lub kilkudniowej stałej pogody (codzienne pobieranie prób) nie dały dostatecznie jasnych wyników.



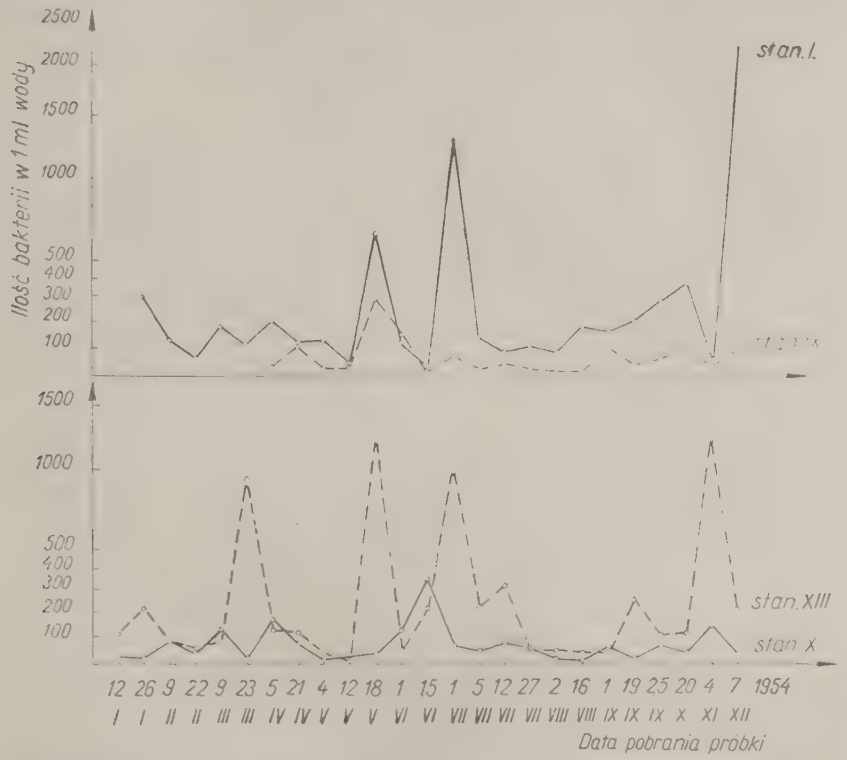
Rys. 1. Zbiornik powierzchniowy w Kozłowej Górze. Stanowiska poboru próbek w 1954 r. Skala 1 : 30 000. ○ — stanowiska badań stałych, ○ — stanowiska badań okresowych

Zeichn. 1. Schematische Darstellung des Flusswasserbehälters in Kozłowa Góra. Standpunkte für Wasserprobentnommen.

Ilości bakterii w powierzchniowej warstwie wody (głębokość 30 cm) na różnych stanowiskach zestawiono na rysunkach 2 i 4. Ilości bakterii na różnych głębokościach stanowiska IX podano na rysunku 3. Średnie miesięczne i roczne ilości bakterii na agarze zestawiono w tabeli I.

Na podstawie tabeli I oraz rysunków 2 i 4 można stwierdzić, że obserwacje i wnioski podane poprzednio przez P a l u c h a i współpr. (1956) znalazły tutaj potwierdzenie. Odnosi się to do charakterystycznego rozmieszczenia bakterii w wodzie powierzchniowej na przestrzeni od ujścia do zbiornika rzeki Brynicy (stanowisko I), aż do dolnej części zbiornika (stanowisko IX) i ujęcia wody (stanowisko X) oraz odpływu (stanowisko XIII). Ilość mikroflory bakteryjnej przy ujęciu znacznie maleje w stosunku do jej ilości przy dopływie. Wahania średnich miesięcznych ilości bakterii na stanowisku I wynosiły od 70 do 400 bakterii na 1 ml (na agarze), na stanowisku IX od 10 do 120, a na stanowisku X od 12 do 240. Średnia roczna wynosiła 315 bakterii na 1 ml na stanowisku I, 81 na stanowisku IX

i 62 na stanowisku X. Ilość bakterii na stanowisku X zmniejszyła się o 80% w porównaniu z ilością na stanowisku I.



Rys. 2. Zmiany ilości bakterii w 1 ml wody na różnych stanowiskach na terenie zbiornika w Kozłowej Górze w ciągu roku 1954

Zeichn. 2. Veränderungen der Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers an verschiedenen Standpunkten in den Gebiet des Flusswasserbehälters in Kozłowa Góra im Jahre 1954

Obecne badania również częściowo potwierdziły poprzednie obserwacje, według których ilość bakterii zwiększa się w głębszych warstwach wody (rys. 3). Zjawisko to zaobserwowano na stanowisku IX w lecie (czerwiec, lipiec i sierpień). Na stanowisku X stosunki te były jednak nieco mniej wyraźne. Stwierdzono też, że w okresie wiosennym (marzec, kwiecień, maj) ilości bakterii w głębszych warstwach wody były mniejsze niż na powierzchni. Obserwacje te wydają się być zgodne ze znanymi prawami rozwoju organizmów żywych w wodzie, przy czym wpływają na to między innymi: działanie promieni słonecznych i przenikanie ich w głąb wody, rozwój planktonu, termika wody, wszelkie procesy fizykochemiczne i biologiczne zachodzące przy samooczyszczaniu się wody i inne czynniki.

Tabela I

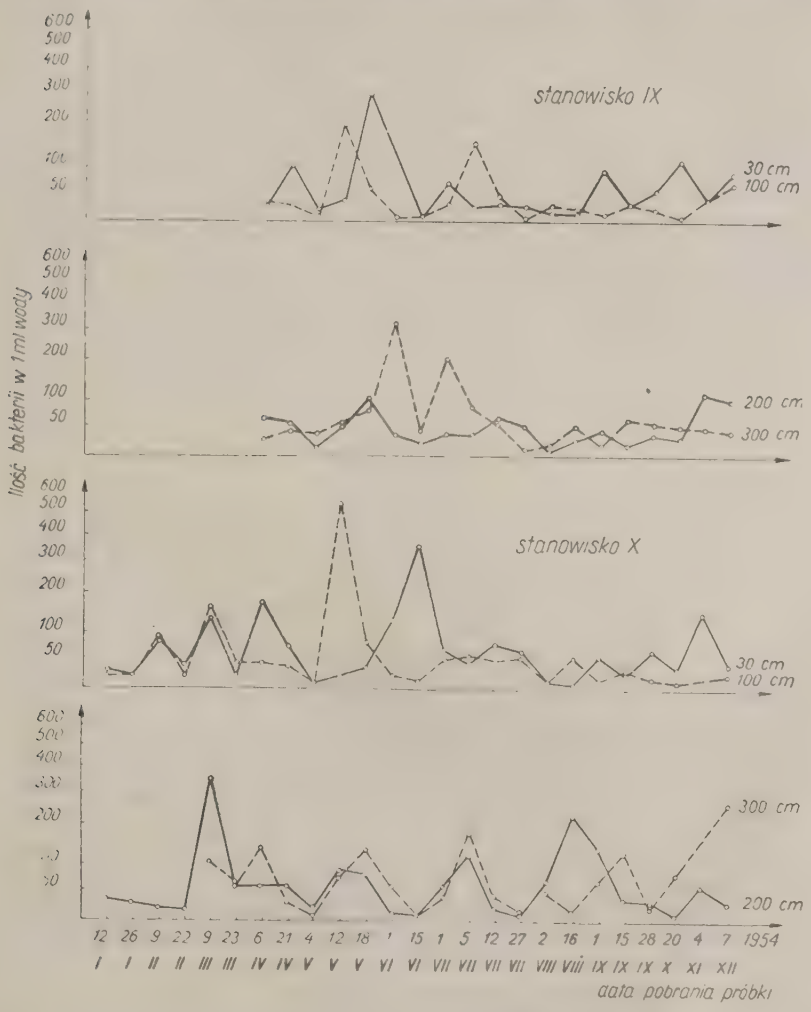
Średnia miesięczna i roczna ilość bakterii w 1 ml wody w 1954 r. (liczone na agarze)
Durchschnittliche Bakterienzahl pro 1 ml Wasser (1954)

Nr stanowiska Nr Standpunkte	Głębokość pobierania próbki w cm Tiefe aus welcher die Probe entnommen wurde (in cm)	Czas inkubacji w godz. Inkubationszeit	Miesiąc Monat												Średnia roczna za 1954 rok Durchschnittliche Wert für 1954 J.
			XII*	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
			Zima Winter			Wiosna Frühling			Lato Sommer			Jesień Herbst			
I	30	24	2200	320	95	150	160	280	70	400	130	165	380	50	315
		96	4300	590	980	2300	1900	780	540	640	545	700	7400	350	1327
IX	30	24	85				60	120	10	37	15	60	10	35	81
		96	400				340	295	40	190	150	125	70	70	214
	100	24	65				30	90	10	46	23	25	30	35	50
		96	260				160	210	135	270	135	150	340	80	184
	200	24	100				60	53	30	40	20	33		115	53
		96	200				300	170	70	200	160	215		85	233
	300	24	40				40	58	180	90	35	33			72
		96	160				450	350	190	375	100	170			242
X	30	24	35	23	60	125	120	20	240	43	12	43	30	140	62
		96	200	220	540	190	300	550	240	210	170	140	800	135	428
	100	24	20	20	50	100	40	210	13	50	30	20	10		57
		96	180	250	175	4300	370	250	95	245	160	130	70		564
	200	24	30	26	20	200	55	60	10	50	135	60	10	55	67
		96	170	100	660	3780	300	190	65	200	230	320	100	135	582
	300	24	250	20		80	80	70	55	65	30	70			69
		96	780	500		3400	425	310	130	245	180	265			634
	400	24	45				60	85		50	50	95		45	59
		96	270				210	520		250	130	180		300	289
XIII	30	24		165	65	470	125	20	130	450	40	130	110	700	266
		96		1200	810	5800	2000	430	600	1000	100	460	880	1600	1051

* grudzień 1953 roku.

W czasie badań ustalono i potwierdzono, że wody spływające z otaczających pól, rowów melioracyjnych, wody ze stawu w parku w Świerklańcu i inne są silnie zanieczyszczone, zawierają duże ilości bakterii (znacznie większe niż wody zbiornika). Wody te, dostając się częściowo do zbiornika, niwelują w pewnym stopniu oczyszczające działanie wody wynikające z zahamowania biegu rzeki.

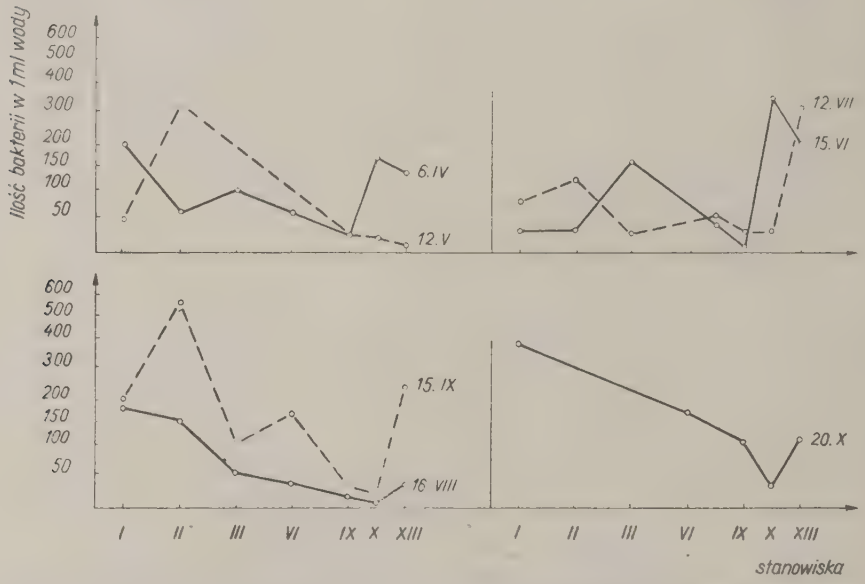
Jak widać z rysunku 1 i tabeli I, obserwowano duże skoki ilości bakterii w poszczególnych dniach badań i duże wahania w średnich miesięcznych. Zjawisko to występowało również w poprzednich latach badań, a także przy badaniu innych zbiorników wodnych (P a l u c h,


stanowisko IX
30 cm
100 cm
200 cm
300 cm
stanowisko X
Ilość bakterii w 1 ml wody
600
500
400
300
200
100
50
12 26 9 22 9 23 6 21 4 12 18 1 15 1 5 12 27 2 16 1 15 28 20 4 7 1954
I I II II III III IV IV V V V VI VI VII VII VII VII VIII VIII IX IX IX X XI XII
data pobrania próbki

Rys. 3. Zmiany ilości bakterii w 1 ml wody na różnych głębokościach stanowisk IX i X w ciągu roku 1954

Zeichn. 3. Die Veränderungen der Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers aus verschiedenen Tiefen an Standpunkten IX und X im Jahre 1954

Radecka i Filipowicz 1956). Potwierdza to znaną tezę, że jednorazowe badanie wody daje pojęcie o jej stanie tylko w momencie pobrania próbki, a nawet częste badanie pozwala jedynie na określenie statycznego stanu wody. Wynika z tego konieczność badania zmian dynamicznych wody, gdyż tylko w ten sposób można w pełni zobrazować zdolności rozwojowe drobnoustrojów, a także biologiczną produktywność danego zbiornika wodnego (Paluch 1955, Paluch i Dobrzański 1956).



Rys. 4. Wahania ilości bakterii w 1 ml wody powierzchniowej — wzdłuż przekroju Płn.-płd. w ciągu roku 1954

Zeichn. 4. Die Schwankungen der Bakterienzahl pro 1 ml des Oberflächenwassers an verschiedenen Standpunkten im Jahre 1954

Występowanie bakterii z grupy pałeczki okrężnicy stwierdzono prawie przy każdym pobieraniu próbek wody. Miano *coli* wahało się w 1954 r. od 0,1 do powyżej 10. Stwierdzono występowanie *Escherichia coli* typ jelitowy *I* i *II*, *Aerobacter aerogenes*, *Esch. intermedium* i jakiegoś typu pośredniego, którego nie udało się określić. Typ jelitowy pałeczki okrężnicy stwierdzano sporadycznie na różnych stanowiskach, co świadczy o prawie stałym dopływie substancji ściekowych. W szczególności podane typy pałeczki okrężnicy występowały jak następuje:

Escherichia coli typ jelitowy *I*	— 7 razy
Escherichia coli typ jelitowy *II*	— 25 „
Aerobacter aerogenes	— 15 „
Esch. intermedium	— 86 „
typ nieokreślony	— 57 „

Źródłem typu jelitowego jest dopływ (rzeka Brynica), ścieki wsi Niezdary, wody spływające do zbiornika z pól i inne.

Na podstawie szczegółowych wyników badań można stwierdzić, że stan bakteriologiczny zbiornika wyrażał się przeciętną roczną (za 1954 r.) ilością bakterii, dających wzrost na agarze w temp. 37° po 24 godzinach, wynoszącą w 1 ml wody od 57 do 81. Stan sanitarny zbiornika był więc w 1954 r. nieco lepszy niż w obu latach poprzednich. Można by to przypisać między innymi prawdopodobnie i temu, że przez okres kilku miesięcy dopływały do zbiornika wody wgłębne doprowadzone rurociągiem z miejscowości Bibiela. Wody te były bardzo czyste bakteriologicznie. Dopływały one w ilości nieco mniejszej od dopływu rzeki Brynicy przy normalnym jej stanie. Przyczyniało się to niewątpliwie do poprawy jakości wody w zbiorniku, jednocześnie jednak nieco zmieniając normalny obraz rozwoju mikroflory, procesów biochemicznych itp.

Identyfikacja niektórych bakterii rosnących na agarze i żelatynie, wyosobnionych ze stanowisk I i IX, nie wykazywała bakterii typowych dla środowiska wodnego. Większość zidentyfikowanych form stanowiły gatunki bytujące w glebie i wodzie, należące do rodzajów: *Micrococcus, Sarcina, Bacterium, Chromobacterium, Bacillus* (z agaru), oraz *Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Bacterium* i *Bacillus* (z żelatyny). Spośród zidentyfikowanych szczepów wyosobnionych z żelatyny większość ją upłynniała. Nie wszystkie wyosobnione szczepy udało się zidentyfikować.

LITERATURA

1. Paluch J., Radecka S., Filipowicz J. i Burmecha H., 1955: Stan bakteriologiczny wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze. *Biuletyn Zakładu Biologii Stawów PAN.*
2. Paluch J., Radecka S. i Filipowicz J., 1956: Stan sanitarny górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach. *Acta Microbiol. Polon.*, 5:187.
3. Paluch J., 1955: Próby określenia dynamiki przemiany materii w wodzie powierzchniowego zbiornika wodnego w Kozłowej Górze. I. Dobowe zmiany tlenu. *Polsk. Arch. Hydrobiol.*, 3.
4. Paluch J. i Dobrzański R., 1956: Próba określenia dynamiki przemiany materii w wodzie powierzchniowego zbiornika wodnego w Kozłowej Górze. II. Dobowe zmiany tlenu, BZT_5, dwutlenku węgla, stężenia jonów wodorowych, ilości bakterii i planktonu. *Acta Microbiol. Polon.*, 5:181.

J. Paluch, S. Radecka, M. Zdybiewska und *J. Filipowicz*

DIE MIKROBIOLOGISCHE CHARAKTERISTIK DES FLUSSWASSERSBEHÄLTERS FÜR WASSERLEITUNGSZWECKE IN KOZŁOWA GÓRA

Zusammenfassung

Diese Arbeit bildet die Fortsetzung im J. 1952 begonnender Untersuchungen von Paluch u. Mitarbeiter (1956) über den Sanitätszustand des Flusswassersoberflächenbehälters für Wasserleitungszwecke in Kozłowa Góra. Im Verlauf des Jahres 1954 wurden fast alle 14 Tage Wasserproben an vier festen Standpunkten (I, IX, X, XIII) aus verschiedenen Tiefen, sowie allmonatlich an den übrigen Stand-

punkten (Zeichn. 1) entnommen. Es wurde die Keimzahl auf Fleischextrakt-Pepton-Agar und Gelatinennährboden, sowie Colititer und Colityp nach der Methodik des Staatsinstitutes für Hygiene bestimmt. Zusätzlich wurde die teilweise Identifizierung der auf Agar und Gelatine gezüchteten Bakterien von den Standpunkten I und IX durchgeführt.

Der ausnehmend günstige Einfluss der Wasseransammlung im Oberflächenbehälter auf die Verringerung der Keimzahl im Verhältniss zu jener von zuflüssendem Wasser, konnte vollauf bestätigt werden. Man stellte fest, dass zur Sommerzeit die Keimzahl in der Oberflächenschicht des Wassers geringer ist als in grösserer Tiefe, während im Frühjahr das Verhältniss umgekehrt ist.

Es treten im Behälter folgende Arten von Colibakterien auf: *Escherichia coli* vom Darmtyp I und II, *Aerobacter aerogenes, Esch. intermedium* und ein Zwischentyp dessen Identifizierung nicht gelang. Es wurden die Verunreinigungsquellen des Behälters mit Abwassersubstanzen ermittelt, auch wie die Verunreinigungsquellen des Behälterswassers mit dem Darmtyp des *E. coli.* wurden festgestellt. Im Verlauf des ganzen Jahres 1954 betrug der Colititer von 0,1 bis über 10.

Es wurde erwiesen, dass der Sanitätszustand des Behälters im Laufe des Jahres 1954 besser war als in beiden vorhergehenden Jahren.

Im Wasser des Beckens und im Zuflusswasser wurde eine grosse Vielfältigkeit von Bakterien nachgewiesen. Unter den am öftesten auftretenden wurden mehr als zehn normal im Boden und Wasser lebende Arten identifiziert. Nur im Wasser auftretende Formen wurden nich festgestellt. Es gelang nicht alle isolierten Kulturen zu identifizieren.

Die im Jahre 1954 durchgeführten Untersuchungen haben die früheren Arbeiten von Paluch u. Mitarbeiter an diesem und anderen Behältern bestätigt (Paluch *et al* 1956, Paluch u. Dobrzański 1956, Paluch 1955).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 181—186

J. Paluch i *R. Dobrzański*

PRÓBY OKREŚLENIA DYNAMIKI PRZEMIANY MATERII W WODZIE POWIERZCHNIOWEGO ZBIORNIKA WODNEGO W KOZŁOWEJ GÓRZE

II. DOBOWE ZMIANY ZAWARTOŚCI TLENU, BIOCHEMICZNEGO ZAPOTRZEBOWANIA TLENU, DWUTLENKU WĘGLA, STĘŻENIA JONÓW WODOROWYCH ORAZ ILOŚCI BAKTERII I PLANKTONU

Z Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych i Katedry Technologii Wody i Ścieków Politechniki Śląskiej w Gliwicach

W pierwszej części pracy (P a l u c h 1955) przedstawiono obraz przemian tlenu zachodzących w wodzie w ciągu doby na różnych jej głębokościach w okresie od wiosny do jesieni. Badania te prowadzono w powierzchniowym zbiorniku wodnym, powstałym przez przegrodzenie tamą doliny rzeki i zatrzymanie biegu tej rzeki, a przeznaczonym dla celów wodociągowych. Wykazano tam między innymi konieczność prowadzenia tego rodzaju badań, gdyż zachodzące w ciągu doby zmiany ilościowe pierwiastków biogennych pozwalają na uchwycenie dynamicznych przemian fizykochemicznych i biologicznych, zachodzących w wodach otwartych. Uchwycenie rodzaju i natężenia tych przemian mogłoby pozwolić na regulowanie biologicznej produktywności zbiorników wodnych, co z kolei może niekiedy ułatwić przeprowadzenie procesów uzdatniania wody dla celów wodociągowych, czerpanej z takich zbiorników. Badania te mogą też mieć znaczenie z punktu widzenia sanitarnego, dostarczając informacji o możliwościach rozwojowych drobnoustrojów w danym zbiorniku wodnym.

Same zmiany stosunków tlenowych zachodzące w ciągu doby nie obrazują jednak jeszcze całkowitej przemiany materii w wodzie, chociaż stanowią jeden z jej głównych czynników.

Przedstawione w tej pracy w skrócie częściowe wyniki stanowią też tylko kontynuację rozszerzonych badań wykonanych w 1954 roku i dalej prowadzonych w 1955 i 1956 roku.

W roku 1954 zbadano zmiany zawartości tlenu w wodzie, nasycenia wody tlenem, biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT_5), zawartości dwutlenku węgla, stężenia jonów wodorowych oraz ilości bakterii i nannoplanktonu. W 1955 r. badano zawartość tlenu, potencjał oksydo-redukcyjny wody, stężenie jonów wodorowych oraz ilość bakterii wyrastających na różnych podłożach.

METODYKA PRACY

Próby wody do badań pobierano w ciągu 1954 r. raz na miesiąc w dniach 27/28 IV, 25/26 V, 26/27 VI, 28/29 VII, 27/28 VIII, 25/26 IX oraz 7/8 XII, możliwie w czasie ustalonej pogody, w ciągu całej doby co dwie godziny z głębokości 30, 100, 200, 300 i więcej cm, zależnie od stanu wody. Pobieranie próbek rozpoczynano o godz. 8 rano i kończono o godz. 6 dnia następnego. Miejscem pobierania próbek było stałe stanowisko badań biologicznych, bakteriologicznych i fizyko-chemicznych opisane w innych pracach (Paluch 1956, Paluch i współpr. 1955, 1956), oznaczone jako stanowisko nr IX.

Próbki wody do oznaczeń fizykochemicznych i biologicznych pobierano przy pomocy czerpacza wody Ruttnera; próbki do oznaczeń bakteriologicznych pobierano innym batometrem z jałowymi butelkami pojemności 50 ml, z korkami szlifowanymi. Wszystkie próbki pobierano w dwóch powtórzeniach.

Temperaturę wody mierzono na danej głębokości z dokładnością do 0,1°, tlen oznaczano metodą Winklera, nasycenie wody tlenem obliczano uwzględniając ciśnienie atmosferyczne w czasie pobierania próbek, BZT_5 określano jako różnicę ilości mg/l tlenu oznaczonego zaraz po pobraniu próbki i po 120 godzinach. Wolny CO_2 oznaczano w oddzielnych próbkach, pobranych według zasad analizy gazowej, przez miareczkowanie przy pomocy Na_2CO_3; *pH* wody oznaczano kolorymetrycznie komparatorem z dokładnością do 0,2. Ilość bakterii w 1 ml obliczano metodą płytkową, stosując jako podłoże agar mięsno-peptonowy i żelatynę (24 godzin hodowli w 37° ± 1°, oraz 48 godzin hodowli w 20°±1°). Nannoplankton w kwietniu i maju liczono w komorze Sedgwick-Raftera, w pozostałych zaś miesiącach w komorze Kolkwitza.

TEMPERATURA WODY

Temperaturę wody, jako jeden z czynników kształtujących stosunki tlenowe, zawartość CO_2, ilość bakterii i planktonu, należy rozpatrywać z dwóch punktów widzenia: zmiany w ciągu doby na poszczególnych głębokościach i zmiany w poszczególnych godzinach na różnych głębokościach.

W ciągu doby wahania termiczne wody w poszczególnych miesiącach nie wykazywały istotnych różnic, poza poziomem wynikającym z przyczyn klimatycznych (pory roku). Normalne zmiany temperatury wody, zależne od temperatury powietrza, nie były duże i mieściły się w granicach 0,9 - 1,5° w warstwie powierzchniowej wody. Jeszcze mniejsze wahania notowano w warstwach głębszych wody. W ciągu doby temperatura wody kształtowała się na całej głębokości następująco:

	Głębokość w cm	Temperatura
kwiecień	250	6,5 - 7,5°
maj	260	14,0 - 17,8°
czerwiec	260	23,0 - 23,9°
lipiec	320	20,0 - 22,2°
sierpień	300	18,8 - 19,6°
wrzesień	300	12,8 - 13,2°
grudzień	250	1,5 - 3,2°

Skoki termiczne (termokliny) w poszczególnych miesiącach były niewielkie, co jest zrozumiałe ze względu na małą głębokość zbiornika w punkcie badań, związaną z niskim stanem wody w 1954 r. Utrzymywanie się częstej homotermii jest też wynikiem stałego mieszania wód aż do dna, między innymi pod wpływem wiatrów.

NASYCENIE WODY TLENEM

Procentowe nasycenie wody tlenem układało się dość charakterystycznie. Od kwietnia do lipca obserwowano na poszczególnych głębokościach wzrost nasycenia wody tlenem, przy czym w godzinach popołudniowych występowało przesycenie dochodzące do 120% o. W sierpniu i wrześniu woda wykazywała w ciągu całej doby deficyt tlenowy. W grudniu istniało prawie pełne nasycenie wody tlenem. W miarę wzrostu głębokości wody nasycenie wody tlenem obniżało się, co świadczy o wzroście w głębszych warstwach wody procesów zużywających tlen. Zaobserwowano też zależność nasycenia wody tlenem od długości dnia.

Wahania nasycenia wody tlenem w poszczególnych dniach badań na całej głębokości wody wynosiły:

kwiecień	94,6 - 116,9%
maj	72,4 - 102,2%
czerwiec	87,6 - 120,8%
lipiec	88,2 - 114,8%
sierpień	76,8 - 92,7%
wrzesień	78,5 - 93,2%
grudzień	89,9 - 103,4%

Istniejące deficyty tlenowe, jak i obserwowane przesycenie wody tlenem w 1954 r., były mniejsze niż w 1953 r., jednak w ciągu obu tych okresów stwierdzono całkowitą zgodność wyników tak w czasie (w ciągu doby i roku), jak na różnych głębokościach.

ZAWARTOŚĆ TLENU I DWUTLENKU WĘGLA

Bezwzględna zawartość tlenu w wodzie zależy przede wszystkim od temperatury wody. Zgodnie z wahaniami temperatury zawartość tlenu zmniejsza się od wiosny do lata, a następnie do jesieni powiększa się. Zaobserwowano i wykazano też w ciągu całego okresu badań na poszczególnych głębokościach dużą zależność zawartości tlenu od ilości dwutlenku węgla. Zwiększaniu się ilości tlenu w ciągu doby odpowiadał spadek ilości dwutlenku węgla i odwrotnie. Specjalnie dokładnie widać było tę zgodność w dniu 26/27 VI.

Od wiosny do jesieni zaobserwowano w wodzie powierzchniowej wzrost zawartości CO_2, np. w maju ilość CO_2 wahała się w ciągu doby od 1.9 do 3.5 mg/l, w lipcu 2.0 - 4,2 mg l, w sierpniu i wrześniu 3,7 - 5,1 mg/l. Od wiosny do lata ilość CO_2 w ciągu doby wahała się w poszczególnych godzinach, osiągając minimum dobowe koło godz. 16, maksimum zaś nad ranem około godz. 4. Od sierpnia do grudnia zawartość CO_2 w ciągu doby wyrównywała się, z lekko zaznaczonym minimum w godzinach południowych, a maksimum w godzinach nocnych. Wydaje się to zgodne z procesami asymilacyjnymi roślin.

BIOCHEMICZNE ZAPOTRZEBOWANIE TLENU

Pięciodniowe biochemiczne zapotrzebowanie tlenu nie wykazywało dużych wahań. Przedstawiało się ono na całej głębokości wody następująco (w mg O_2 na litr):

kwiecień	3,27 - 5,50
maj	0,39 - 2,04
czerwiec	1,60 - 4,53
lipiec	1,11 - 2,85
sierpień	1,16 - 3,36
wrzesień	0,75 - 2,88
grudzień	2,70 - 4,30

Jak więc widać, najwyższe BZT_5 stwierdzono w kwietniu i grudniu, najniższe w maju i wrześniu. Uzyskane wyniki nie pozwalają na wyciągnięcie dokładniejszych wniosków, tym bardziej, że oznaczenia BZT_5 wykonywano co 4 godziny, a nie co dwie jak poprzednie.

STĘŻENIE JONÓW WODOROWYCH

Stężenie jonów wodorowych również nie wykazywało specjalnych wahań ani w poszczególnych dniach badań, ani też w ciągu doby na poszczególnych głębokościach. W ciągu roku *pH* wody mieściło się w granicach 7,4 - 8,0, w poszczególnych zaś dniach wahania wynosiły 0,1 - 0,2 *pH*, a więc mieściły się w granicach błędu pomiarowego.

ILOŚĆ BAKTERII I PLANKTONU

Ilości bakterii, dających wzrost na agarze mięsno-peptonowym i żelatynie, w badanym okresie w ciągu całej doby wahały się na głębokości do 320 cm następująco (na 1 ml):

	agar	żelatyna
kwiecień	2 - 92	0 - 17
maj	0 - 28	1 - 18
czerwiec	0 - 160	0 - 38
lipiec	5 - 135	15 - 110
sierpień	3 - 190	16 - 500
wrzesień	7 - 146	0 - 13
grudzień	1 - 59	6 - 160

W okresie od kwietnia do lipca minimalne ilości bakterii w ciągu doby stwierdzono na agarze w nocy i nad ranem około godz. 4, maksymalne zaś w godzinach między 16 a 20, w sierpniu minimum było około godz. 8, maksimum o godzinie 12, we wrześniu minimum o godz. 20, maksimum o godz. 8. Wreszcie w grudniu minimum stwierdzono w nocy między godz. 24 a 8 rano, maksimum w południe o godz. 12.

Na całej głębokości wody minimalne i maksymalne ilości bakterii występowały mniej więcej w tych samych godzinach.

Wyniki uzyskane na żelatynie wskazują, że w kwietniu i maju najmniej bakterii było w nocy, najwięcej w ciągu dnia; w czerwcu i lipcu minimum stwierdzono nad ranem, maksimum między godz. 16 a 20, w jesieni zaś minimum występowało przed południem, a maksimum wieczorem.

Otrzymane ilości bakterii rosnących na agarze mięsno-peptonowym i żelatynie wydają się wskazywać na pewną rytmiczność dobową, jednak zbyt mała liczba obserwacji nie pozwala jeszcze na ścisłe sprecyzowanie tego zjawiska.

Jako składniki nannoplanktonu określono ilość planktonu roślinnego i zwierzęcego, liczbę i rodzaj organizmów dominujących oraz składniki tryptonu. Charakterystyczne wyniki tych oznaczeń na 1 ml wody na wszystkich głębokościach były następujące:

	Plankton roślinny	Plankton zwierzęcy	Organizmy dominujące	Trypton roślinny
czerwiec	450-2923	1-5	292-1507	10-61
lipiec	1460-3705	1-5	1331-3077	7-56
sierpień	1056-3028	1-5	613-1790	4-21
wrzesień	846-2445	1-3	—	68-281
grudzień	1228-2359	0-1	647-1294	14-51

Organizmami dominującymi we wszystkich miesiącach były *Chlorococcales*, a w grudniu obok nich dominowały *Flagellata*. Jak widać z podanych wyników, zbiornik w Kozłowej Górze charakteryzuje się dominującą rolą planktonu roślinnego i skąpym występowaniem planktonu zwierzęcego.

Porównując otrzymane w poszczególnych dniach szczegółowe wyniki dotyczące ilości planktonu widać, że we wszystkich miesiącach istnieje zależność między występowaniem na poszczególnych głębokościach planktonu i bakterii. Wzrost ilości bakterii w ciągu doby zachodzi wtedy, gdy zmniejsza się ilość planktonu i na odwrót, przy wzroście ilości planktonu maleje ilość bakterii. Poza tym wzrost ilości planktonu w ciągu doby był zgodny ze wzrostem w wodzie ilości tlenu i nasyceniem wody tlenem. Wreszcie wzrostowi ilości planktonu towarzyszyło zmniejszanie się ilości dwutlenku węgla.

Ścisłej zależności między ilością bakterii a stosunkami tlenowymi w wodzie i ilością dwutlenku węgla nie udało się wykazać, prawdopodobnie na skutek małej ilości obserwacji posiewów bakteryjnych, niezbyt odpowiedniej stosowanej metodyki badania ilości bakterii i przypuszczalnie braku innych jeszcze wskaźników.

WNIOSKI

Na podstawie wykonanych badań można obecnie wyciągnąć w zasadzie pewne wnioski. W streszczeniu byłyby one następujące: zawartość w wodzie tlenu i nasycenie wody tlenem wahały się w ciągu doby i w okresie od wiosny do jesieni 1954 r. w sposób zgodny z wynikami badań z 1953 roku.

Istnieje zależność między zawartością tlenu i dwutlenku węgla, jak też między rozwojem planktonu a zawartością tlenu i dwutlenku węgla. Istnieje też zależność między ilością bakterii i planktonu.

Otrzymane wyniki wydają się wskazywać na pewną zależność między ilością bakterii w wodzie a porą i długością dnia.

Nie udało się wykazać związku między ilością bakterii a stosunkami tlenowymi i zawartością dwutlenku węgla w wodzie. Nie stwierdzono istotnych zmian *pH* wody ani w ciągu doby na różnych głębokościach, ani w ciągu badanego okresu na poszczególnych głębokościach. Podobnie nie wykazano zmian w pięciodniowym biochemicznym zapotrzebowaniu tlenu.

Na podstawie osiągniętych już wyników można stwierdzić celowość prowadzenia tego typu badań w różnych zbiornikach wodnych. Ustalenie bowiem dla danego typu zbiorników lub zbiornika charakteru przemian w nim zachodzących może później ułatwić i umożliwić wyciąganie odpowiednich wniosków ogólnych tylko na podstawie badań pewnych wybranych wskaźników.

LITERATURA

1. Paluch J., 1955: Próby określenia dynamiki przemiany materii w wodzie powierzchniowego zbiornika wodnego w Kozłowej Górze, I. Dobowe zmiany tlenu. *Zeszyty Naukowe Wydz. Inż. Sanit. Polit. Śląskiej*: 46.
2. Paluch J., Radecka S., Filipowicz J. i Burmecha H., 1955: Stan bakteriologiczny wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze: *Zeszyty Naukowe Wydz. Inż. Sanit. Polit. Śląskiej*: 40.
3. Paluch J., Radecka S., Zdybiewska M. i Filipowicz J.: 1956: Charakterystyka mikrobiologiczna wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze przeznaczonego dla celów wodociągowych. *Acta Microbiol. Polon.*, 5:179.

J. Paluch und *R. Dobrzański*

VERSUCHE ZUR BESTIMMUNG DER STOFFWECHSELDYNAMIK IM WASSER DES OBERFLÄCHENBECKENS VON KOZŁOWA GÓRA

II. TAGESWECHSEL DES SAUERSTOFFS, BIOCHEMISCHEN SAUERSTOFFBEDARFES, KOHLENDIOXYDS, DER WASSERSTOFFIONENKONZENTRATION, SOWIE DER KEIMZAHL UND DES PLANKTONS

Zusammenfassung

Im weiteren Verlauf der Versuche (Paluch 1955) über den Stoffwechsel im Wasser, wurden im 24-Stundenzyklus die Veränderungen des Sauerstoffgehaltes, des biochemischen Sauerstoffbedarfes, des CO_2 - Gehaltes, sowie der Wasserstoffionenkonzentration untersucht. Da die Darstellung der chemischen und biologischen Eigenschaften des Wassers im dynamischen Sinne die Intensität der die biologischen Produktivität von Wasserbehältern bestimmenden Prozesse zu charakterisieren vermag, wurde neben chemischen Indexzahl auch der Gehalt an Bakterien und Nannoplankton untersucht.

Die Wasserproben wurden einmal im Monat durch 24 Stunden, alle 2 Stunden am Standpunkt Nr. IX, welcher in den anderen Arbeiten (Paluch 1955, Paluch *et al* 1955, 1956) beschrieben wurde, entnommen.

Als Versuchsergebniss wurde festgestellt, dass der Sauerstoffwechsel im Wasser ähnlich von sich ging wie im J. 1953, d. h. es bestand unabhänging von der Wassertemperatur im Oberflächenwasser eine Zunahme der Sauerstoffabsorptionsprozesse vom Frühjahr zum Herbst. Diese Prozesse verliefen noch intensiver am Grund, wo trotz der geringen Tiefe des Bechälters, ein etwas stärkeres Sauerstoffdefizit auftrat. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffgehalt, dem Sättigungsgrad des Wassers mit Sauerstoff und der Tageslänge, sowie zwischen dem Gehalt an Sauerstoff und an Kohlendioxyd.

Der Bakteriengehalt des Wassers wies innerhalb von 24 Stunden einen gewissen Rythmus auf. Im allgemeinen waren am Tage mehr Bakterien vorhanden, in der Nacht fiel die Zahl. Es war auch beim Absinken des Planktongehaltes die Keimzalh höher, umgekehrt fiel sie beim Anstieg des Gehaltes an Plankton. Die Änderungen des Planktongehaltes im 24-Studenzyklus verliefen im Zusammenhang mit dem Gehalt an Sauerstoff und Kohlendioxyd.

Es konnte keine exakte Abhängigkeit zwischen der Bakterienzahl und dem Gehalt an Sauerstoff und CO_2 nachgewiesen werden. Änderungen der *pH* des Wassers konnten weder in verschiedenen Tiefen noch an verschiedenen Versuchstagen festgestellt werden, wie dies auch für biochemischen Sauerstoffbedarf nicht beobachtet wurde.

Die Durchführung dieser Art von Untersuchungen an verschiedenerlei Oberflächenwasserbecken erscheint recht zweckmässig.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 187—196

J. Paluch, S. Radecka i *J. Filipowicz*

STAN SANITARNY GÓRNEGO BIEGU WISŁY I JEJ DOPŁYWÓW ORAZ TERENU ZALEWU W GOCZAŁKOWICACH

Z Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych i Katedry Technologii Wody i Ścieków Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Wody zasilające zbiornik goczałkowicki, prócz wody rzeki Wisły ujętej na przegrodzie, należą do części zlewni rzeki Iłownicy uchodzącej do Wisły poniżej przegrody. Zlewnia Wisły i jej górnego dorzecza, jak też zlewnia Iłownicy, są uprzemysłowione, a Wisła i jej dopływy stanowią odbiorniki ścieków przemysłowych i fekalno-gospodarczych licznych osiedli.

Stosunki hydrologiczne zlewni zbiornika goczałkowickiego są skomplikowane. Wpływają one na ilość przepływu wody w Wiśle i dopływach, a więc tym samym decydują o stopniu rozcieńczenia ścieków przemysłowych i fekalno-gospodarczych uchodzących lub infiltrujących do tych odbiorników. Tak więc decydują o ilości, jakości i możliwościach rozwoju mikroflory bakteryjnej tych wód.

Przedstawione w niniejszej pracy częściowe wyniki badań wód górnej Wisły i jej dopływów mają na celu wykazanie sanitarnego stanu bakteriologicznego tych wód, jak też scharakteryzowanie bakteriologicznego stanu wód znajdujących się na obszarze zalewu. Równolegle z badaniem stanu bakteriologicznego przeprowadzono badanie biologiczne i fizykochemiczne tych wód. Wyniki tych ostatnich badań są tematem oddzielnych opracowań (Prace Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych Politechniki Śląskiej 1952 - 1955).

METODYKA BADAŃ

Badanie bakteriologiczne przeprowadzono w 1953 i 1954 r. W 1953 r. uwzględniono tylko okres wiosenny i letni, natomiast badania przeprowadzone w 1954 r. objęły okres zimowy (luty), wiosenny (maj) i letni (sierpień), tj. pory roku, gdy temperatura wód wynosiła poniżej 10°, nieco powyżej 10° i osiągała swoje letnie maksimum.

Jak wynika z analizy istniejących stosunków hydrologicznych, stanowiska pobierania próbek musiały być tak dobrane, by można dać charakterystykę wód niesionych przez poszczególne rzeki i potoki. Stanowiska poboru próbek podano na rysunku 1. Jak widać, stanowiska zagęszczone były w rejonach silnego zanieczyszczenia wód, a więc szczególnie w obrębie większych osiedli z zakładami przemysłowymi.

Próbki wód potoków i rzek mniejszych pobierano przeważnie w nurcie, z głębokości 30 cm. W rzekach większych próbki pobierano w trzech punktach: w po-

bliżu lewego brzegu, pośrodku lub w nurcie i przy prawym brzegu, zależnie od stanu wody z głębokości 30 cm, 100 cm i więcej. Próbki wody w dwóch powtórzeniach pobierano do jałowych butelek pojemności 50 ml z korkiem szlifowanym. Czas między pobraniem próbki a posiewem wynosił od 2 do 12 godzin, co oczywiście ujemnie wpływało na dokładność badań. Jednak inne rozwiązanie było niemożliwe, gdyż odległość laboratorium od badanych miejsc wynosiła 60 - 100 km.

Sanitarną analizę bakteriologiczną wykonano według metodyki stosowanej w stacjach sanitarno-epidemiologicznych, tj. określano ilość bakterii w 1 ml wody, wyrosłych na mięsno-peptonowym agarze po 48±3 godzinach w 37°±1°, na bulionie z żelatyną po 24±2 godzinach w 20°±1°, oraz miano i typ *E. coli* — stosując standardowe podłoża wskaźnikowe i wybiórcze. Próbki wody zależnie od stopnia zanieczyszczenia rozcieńczano w stosunku 1 : 10, 1 : 100 lub 1 : 1000. Wyniki obliczono dla 1 ml wody.

Próbki do analizy bakteriologicznej pobrano z 31 stanowisk na rzece Wiśle, na odcinku od źródeł na zboczach Baraniej Góry aż do Nowego Bierunia, oraz z 44 stanowisk na dopływach Wisły, młynówkach, potokach, stawach rybnych, zastoiskach wodnych itp., łącznie na obszarze zlewni zbiornika goczałkowickiego, obejmującego prawie 680 km².

CHARAKTERYSTYKA BAKTERIOLOGICZNA RZEKI WISŁY

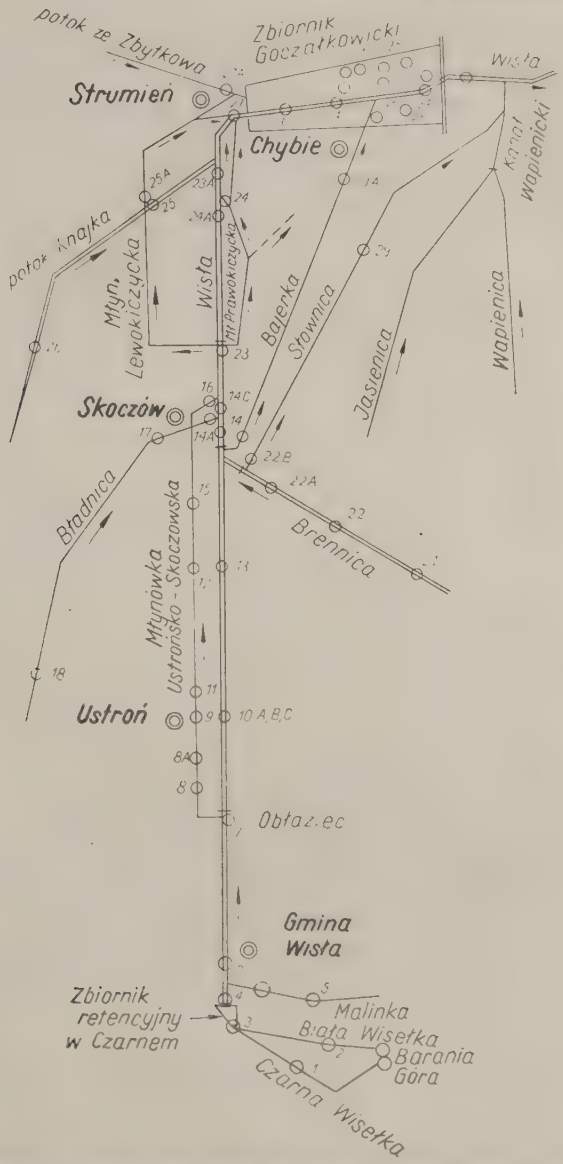
Stan bakteriologiczny wód rzeki Wisły od źródeł aż do przegrody zbiornika goczałkowickiego kształtuje się charakterystycznie (rys. 2). Już same źródliska Wisły, wypływające ze zboczy Baraniej Góry, zawierają przeciętnie w 1 ml wody 50 - 100 bakterii (na agarze i żelatynie). Bardziej szczegółowo stan bakteriologiczny źródlisk Wisły przedstawiono w oddzielnej pracy (P a l u c h i S z y m k i e w i c z 1956).

Po połączeniu się Czarnej i Białej Wisełki ilość mikroflory bakteryjnej w wodzie wzrasta i wynosi na stanowisku III (cofka zbiornika retencyjnego w Czarnem) na głębokości 30 cm dnia 18. VIII. 1953 r. 3200 bakterii i 5. VIII. 1954 r. — 3600 bakterii w 1 ml wody na agarze. Jednakże już na stanowisku IV, około 800 m poniżej stanowiska III, przy przegrodzie zbiornika retencyjnego ilość bakterii rosnących na agarze obniża się do 850 na 1 ml w 1953 r. i 200 na 1 ml w 1954 r., a więc czterokrotnie i osiemnastokrotnie. Na większych głębokościach stanowiska IV ilość bakterii jest większa niż w wodach powierzchniowych, osiągając na głębokości 300 cm 900 bakterii w 1953 r. i 960 w 1954 r., a na głębokości 400 cm nawet 1700 bakterii na 1 ml wody w 1953 r.

Dane te potwierdzają inne wyniki poprzednich badań (P a l u c h, R a d e c k a, F i l i p o w i c z i B u r m e c h a 1956, P a l u c h, R a d e c k a, Z d y b i e w s k a i F i l i p o w i c z 1955) stwierdzające, że wody rzeczne zahamowane w swym biegu oczyszczają się z mikroflory bakteryjnej nader wyraźnie. Równocześnie obserwuje się tutaj inne zjawisko, również zanotowane przez P a l u c h a i współpr. (1956), że ilość bakterii w powierzchniowych zbiornikach wodnych wzrasta w głębszych warstwach wody.

W dalszym biegu Wisły, na stanowisku VII w miejscowości Obłaziec, obserwuje się ujemny wpływ osiedla Wisła na stan bakteriologiczny wody. Mianowicie w lipcu 1953 r. stwierdzono na tym stanowisku do 650 bakterii na agarze i do 6200 na żelatynie w 1 ml wody.

Od tego stanowiska Wisła płynie prawie w całości jako młynówka i przepływając przez miasto Ustroń z zakładem kąpielowym borowinowym i zakładami przemysłowymi „Kuźnia Ustroń" coraz silniej zanieczyszcza się. W 1953 r. na odcinku Obłaziec — Nierodzim koryto Wisły prowadziło bardzo mało wody w okresie badań letnich, natomiast



Rys. 1. Schemat systemów wodnych w rejonie górnego biegu Wisły i stanowiska pobierania próbek wody

Zeichn. 1. Schematische Darstellung des Oberlaufes der Wisła und des Gebietes des Staubeckens bei Goczałkowice

w 1954 r. rzeka prowadziła stosunkowo dużo wody, zanieczyszczonej ściekami miasta Ustronia odprowadzanymi częściowo do Wisły, a przeważnie infiltrującymi przez regulacyjny wał przeciwpowodziowy. W sierpniu 1954 r. poniżej „Kuźni Ustroń" stwierdzono w 1 ml wody 1900 bakterii na 1 ml (na agarze) i całkowite upłynnienie żelatyny.

Około 4 km poniżej Ustronia, na stanowisku XIII w Nierodzimiu, zaobserwowano pewne oczyszczenie wody Wisły charakteryzujące się mniejszą ilością bakterii, wynoszącą 25 i 280 na agarze, a 300 i 465 na żelatynie w 1 ml wody w maju i sierpniu 1954 r.

Stan bakteriologiczny wody Wisły wyraźnie pogarsza się od ujścia do Wisły rzeki Bładnicy w Skoczowie. Bładnica jest bowiem odbiornikiem uciążliwych ścieków, między innymi ścieków zakładów przemysłu filcowego i garbarni. Wpływ tych ścieków odbija się na ilości kolonii bakterii na agarze i żelatynie. Wyniki otrzymane na agarze przedsta-

Tabela I

Ilość bakterii w 1 ml wody Wisły w 1954 r. w rejonie Skoczowa (na agarze)
Die Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers der Wisła bei Skoczów (1954)

Stanowisko Standpunkt	26. V. 1954			5. VIII. 1954		
	Lewy brzeg Das linke Ufer	Środek rzeki Mitte des Flusse	Prawy brzeg Das rechte Ufer	Lewy brzeg Das linke Ufer	Środek rzeki Mitte des Flusse	Prawy brzeg Das rechte Ufer
XIV - Powyżej ujścia Bładnicy	2 500	1 800	40	190*	300*	340*
XIV - 6 - Poniżej ujścia Bładnicy	135 0	142 000	160	10 800	3 000	2 500
XXIII - Jaz w Kiczycach	500	—	240	5 600	3 000	3 100

* stanowisko XIII w Nierodzimiu

wiono w tabeli I. Na rysunku 2 dane te przedstawiono jako średnie wartości dla przekroju poprzecznego Wisły na poszczególnych stanowiskach.

W dalszym swym biegu Wisła ponownie oczyszcza się na odcinku od jazu w Kiczycach aż do miasta Strumień (stanowisko XXVII), osiągając w sierpniu 1954 r. w przekroju poprzecznym Wisły w 1 ml wody 235 bakterii (na agarze).

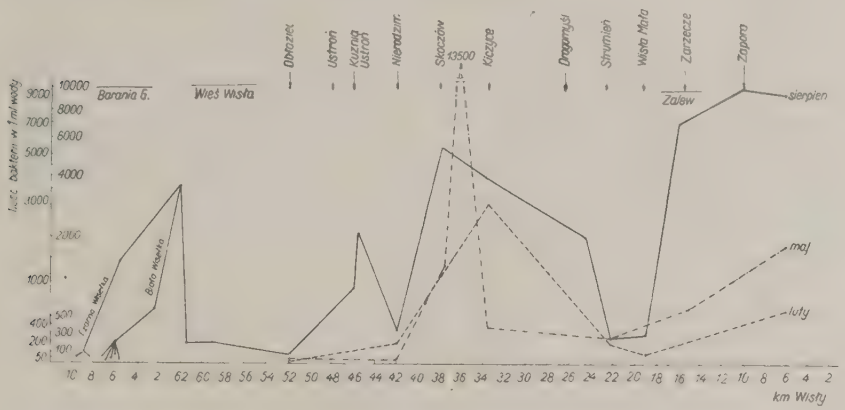
Od miasta Strumień znów wyraźnie uwidacznia się silniejsze zanieczyszczenie Wisły, osiągające swoje maksimum na terenie zbiornika w pobliżu przegrody. W sierpniu 1954 r. zaobserwowano następujące ilości bakterii w 1 ml:

	lewy brzeg	środek rzeki	prawy brzeg
Stan. XXVII-Strumień	250	150	300
Stan. XXVI-A-Przed przegrodą	6700	15400	6400

Tak silny wzrost zanieczyszczenia Wisły wywołują nie tylko ścieki miasta Strumień i innych osiedli przybrzeżnych, ale głównie dopływ silnie zanieczyszczonej rzeki Bajerki.

Wisła, opuszczając teren zbiornika goczałkowickiego, pozostaje w dalszym ciągu silnie zanieczyszczona i zanieczyszczenie to nawet dalej gwałtownie wzrasta, osiągając w pobliżu Nowego Bierunia w sierpniu 1954 r. 180 000 bakterii w 1 ml na agarze i ponad 400 000 bakterii w 1 ml na żelatynie. Jest to znów wynikiem dopływu do Wisły rzek stanowiących odbiorniki ścieków, głównie okręgu przemysłowego Bielska (np. rzeka Iłownica, Jasienica, Wapienica, Biała).

Znaczny wpływ na ilość mikroflory bakteryjnej w wodzie Wisły wywierają jej dopływy, szczególnie rzeka Malinka, Brennica, Bładnica i Knajka.



Rys. 2. Ilość bakterii w 1 ml wody w różnych stanowiskach w górnym biegu rzeki Wisły

Zeichn. 2. Die Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers an verschiedenen Stellen des Oberlaufes der Wisła

Malinka w odległości 4,5 km od ujścia (stanowisko V) w sierpniu 1953 r. niosła w 1 ml wody 220, a w sierpniu 1954 r. 450 bakterii na agarze, przy całkowitym upłynnieniu żelatyny. W rzece Brennicy w odległości 12 km od ujścia (stanowisko XXI) wykazano w sierpniu 1954 r. 1000 bakterii na agarze. Bliżej ujścia, na piątym kilometrze (stanowisko XXII) stwierdzono 1100 bakterii i całkowite upłynnienie żelatyny, a 2,5 km od ujścia (stanowisko XXII-A) niesiona przez rzekę ilość bakterii wynosiła w 1 ml:

	na agarze	na żelatynie
18.VIII.1953.	7000	3000
10.VIII.1954.	500	800

Rzeka Bładnica uchodząca do Wisły w Skoczowie odznacza się różnym stopniem zanieczyszczenia. Na przykład na stanowisku XVIII (11 km od ujścia) w dniu 18.VIII.1953 r. stwierdzono 1200 i 4900 bakterii na agarze oraz 4800 na żelatynie. Na stanowisku XVII (1,5 km od ujścia),

już w Skoczowie powyżej fabryki kapeluszy filcowych, ilość bakterii wynosiła:

	na agarze	na żelatynie
18.VIII.1953.	2000	3500
13.VIII.1954.	400	300

Przy samym ujściu Bładnicy do Wisły, po przyjęciu ścieków garbarni, ilość bakterii gwałtownie wzrasta osiągając pośrodku rzeki dnia 26.V. 1954 r. na agarze — 42 000, a dnia 13.VIII.1954 r. — 93 400. Żelatyna całkowicie zostaje upłynniona. Widać z tego, że Bładnica jest głównym źródłem zanieczyszczenia górnej Wisły, bardzo silnie wzbogacając ją w mikroflorę bakteryjną.

Również silne zanieczyszczenie, dające wzrost ilości drobnoustrojów, stwierdzono w potoku Knajka, uchodzącym do Wisły w mieście Strumień.

Młynówka Ustrońsko-Skoczowska, rozpoczynająca się przy jazie w Obłaźcu, zasadniczo prowadzi całą normalną wodę Wisły. Przepływając przez miasto Ustroń i osiedla leżące przy drodze do Skoczowa przyjmuje ścieki fekalno-gospodarcze i przemysłowe, co powoduje coraz większe jej zanieczyszczenie, przejawiające się zwiększaniem ilości mikroflory bakteryjnej. Obrazuje to zestawienie podane w tabeli II.

Tabela II

Ilość bakterii w 1 ml wody w młynówce Ustrońsko-Skoczowskiej
Die Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers des Mühlbaches Ustronie — Skoczów

Stanowisko Standpunkt	18. VIII. 1953		6-3. VIII. 1954	
	agar Agar	żelatyna Gelatine	agar Agar	żelatyna Gelatine
VII — Wisła w Obłaźcu	1 600	450	55	upłyn.
VIII — Młynówka przed Ustroniem	450	150	35	upłyn.
IX — Młynówka w Ustroniu	1 100	800	500	1 500
X - C — Młynówka w Ustroniu	1 000	4 000	—	—
XI — Młynówka poniżej Ustronia	1 900	26 000	1 800	4 100
XII — Młynówka w Nierodzimiu	3 000	2 600	1 100	upłyn.
XV — Młynówka w Harbutowicach	2 800*	upłyn.*	7 300	upłyn.
XVI — Młynówka przy ujściu do Wisły w Skoczowie	59 000	upłyn.	14 000	upłyn.

* dnia 30 VII 1953 r.

Tak więc młynówka Ustrońsko-Skoczowska zwraca do Wisły w Skoczowie wody silnie zanieczyszczone.

Potok Bajerka również stanowi właściwie młynówkę. Bierze on początek, jak widać na rysunku 1, z rzeki Brennicy i przepływając ku północy w kierunku miasta Chybie wpada do Wisły na terenie zbiornika

goczałkowickiego, zaopatrując po drodze swymi wodami między innymi szereg stawów rybnych i stanowiąc też w swym dalszym odcinku odbiornik ścieków cukrowni „Chybie". Podobny charakter posiada potok Iłownica, uchodzący do Wisły już poniżej przegrody zbiornika goczałkowickiego. Próby do analizy bakteriologicznej z Bajerki ze stanowiska XXX-A i XXXI, jak też z Iłownicy (stanowisko XXIX), wykazały w dniu 14.VIII.1954 r. następującą ilość bakterii w 1 ml wody:

	na agarze	na żelatynie
Stan. XXX — A — Bajerka przy drodze Chybie — Landek	1 700	7 700
Stan. XXXI — Bajerka na terenie zalewu	77 500	281 000
Stan. XXIX — Potok — Iłownica	550	2 700

Na uwagę zasługują jeszcze wyniki otrzymane z analizy wód znajdujących się na terenie zalewu. Na tym terenie o powierzchni około 34 km² zbadano stan bakteriologiczny niektórych stawów rybnych, rowów melioracyjnych i zastoisk wodnych, głównie wód opadowych. Stwierdzono, że w stawach rybnych w Zarzeczu (stanowisko XXXV) ilość bakterii w 1 ml wody wynosiła w 1953 r. od 1200 do 5400 (na agarze) oraz 800 do 2900 (na żelatynie). W sierpniu 1954 r. ilości te były mniejsze i w sześciu badanych stawach wahały się od 100 do 1500 bakterii na 1 ml (na agarze) i od 300 do 150 (na żelatynie). Znacznie większe ilości bakterii znaleziono w starych rowach melioracyjnych; wahały się one w sierpniu 1954 r. od 550 do 3300 bakterii na 1 ml (na agarze) i od 1100 do 7600 (na żelatynie). Podobne ilości bakterii stwierdzono w zastoiskach wodnych.

CHARAKTERYSTYKA WYSTĘPOWANIA PAŁECZKI OKRĘŻNICY

Miano *coli* omawianych wód było różne, zależnie od miejsca i stopnia zanieczyszczenia wody. W wodzie rzeki Wisły już w pobliżu źródlisk wynosiło 10 lub powyżej 10. Na tym samym poziomie utrzymywało się do Nierodzimia (stanowisko XIII). W Nierodzimiu stwierdzono miano 0,1 w maju, a 5 w lipcu i sierpniu 1953 r. oraz w sierpniu 1954 r. Dopływ wód rzeki Bładnicy i Brennicy nie powodował zwiększenia miana *coli*. Najniższe miano w Wiśle w Skoczowie wykazywało wartość 0,1 (maj 1953 r.), najwyższe zaś wynosiło 10, a nawet powyżej 10 (prawy brzeg Wisły w sierpniu 1954 r.). Na tym poziomie utrzymywało się w wodach Wisły aż do Strumienia. Na terenie samego zalewu goczałkowickiego obniżało się, osiągając na stanowisku XXXIII 0,01 w maju 1953 r., 1 w sierpniu 1954 r., a 1 oraz 5 na stanowisku XXXIV w sierpniu 1954 r. W Wiśle poniżej terenu zalewu przed Nowym Bieruniem stwierdzono miano *coli* 10 i powyżej 10 nawet przy bardzo dużej ilości bakterii.

Dopływy Wisły miały podobne miano *coli* wahające się w okresie badań od 0,01 do 10 i powyżej 10.

Pod względem typu znalezione pałeczki okrężnicy w większości wypadków zaliczono do *Escherichia intermedium* i *Aerobacter aerogenes*. W kilku wypadkach nie udało się określić typu pałeczki okrężnicy.

Pałeczki okrężnicy typu jelitowego stwierdzono w licznych punktach poboru próbek w wodzie Wisły. Ten typ pałeczki stwierdzono już poniżej połączenia się Czarnej i Białej Wisełki, na stanowisku IV w zbiorniku retencyjnym w Czarnem i to na głębokości do 300 cm. W dalszym

biegu Wisły typ ten stwierdzono na stanowisku VII w Obłaźcu, na stanowisku X-A w Kuźni Ustrońskiej, na stanowisku XIII w Nierodzimiu (lewy brzeg Wisły), na stanowisku XIV-C po ujściu Błądnicy w Skoczowie i na stanowisku XXXIV we wsi Zarzecze Dolne na terenie zalewu.

W dopływach Wisły i innych wodach typ jelitowy pałeczki okrężnicy stwierdzono w Knajce (stanowisko XXV) i w rowach melioracyjnych (stanowisko XXXVI). Prawdopodobnie typ jelitowy występował też w innych wodach, gdzie wykazano miano *coli* powyżej 10.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań bakteriologicznych można wyciągnąć następujące wnioski:

Woda rzeki Wisły już od źródlisk jest zanieczyszczona substancjami organicznymi ułatwiającymi rozwój bakterii dających wzrost na mięsno-peptonowym agarze i żelatynie.

Na skutek zahamowania biegu górnej Wisły przegrodą, w powstałym zbiorniku retencyjnym w Czarnem ilość bakterii gwałtownie obniża się. Następnie w wyniku stałego zanieczyszczania wody różnymi ściekami aż do Skoczowa wzrasta ilość bakterii w wodzie. Od Skoczowa do Strumienia woda oczyszcza się, na co wskazuje zmniejszenie się ilości bakterii. Od Strumienia, tj. od początku zalewu goczałkowickiego, ilość bakterii w Wiśle znów silnie zaczyna wzrastać. Na terenie właściwego zalewu stan bakteriologiczny wody w Wiśle jest najgorszy.

Dopływy Wisły, jak też inne wody zasilające budowany zbiornik goczałkowicki, są na ogół silnie zanieczyszczone i niosą względnie duże ilości bakterii. Podobny charakter mają wody występujące na terenie zalewu, stawy rybne, rowy melioracyjne, zastoiska wodne.

Miano *coli* wód Wisły, dopływów oraz innych wód tej części dorzecza Wisły jest na ogół niskie. Częste występowanie typu jelitowego pałeczki okrężnicy świadczy o dopływie do Wisły ścieków fekalnych, które mogą wnosić również bakterie chorobotwórcze. Woda Wisły, mimo pozornie dużej czystości, może stanowić pewne niebezpieczeństwo epidemiologiczne dla ludzi licznie a nawet masowo używających w lecie kąpieli, jak też dla budującego się zbiornika goczałkowickiego.

Należy przypuszczać, że mimo złego stanu sanitarnego wód zaopatrujących budowany zbiornik, stan wody w samym zbiorniku znacznie poprawi się pod względem bakteriologicznym.

Otrzymane wyniki potwierdzają konieczność oczyszczania ścieków fekalno-gospodarczych i przemysłowych z zakładów powyżej budowanego zbiornika. Potwierdzają one słuszność decyzji odpowiednich władz, polecających wybudowanie takich oczyszczalni ścieków w tych osiedlach i zakładach przed uruchomieniem zbiornika goczałkowickiego.

Konieczne jest utworzenie stref ochrony sanitarnej nie tylko samego ujęcia wodnego na terenie zbiornika, ale także na terenie całego zbiornika i jego zlewni, obejmując nadzorem sanitarnym całe dorzecze górnej Wisły aż po źródliska na Baraniej Górze.

Należy kontynuować badania bakteriologiczne wód zasilających zbiornik po jego uruchomieniu, śledząc przemiany jakości i ilości mikroflory bakteryjnej w czasie napełniania zbiornika i po jego napełnieniu. Prace te są zaplanowane i już częściowo rozpoczęte.

LITERATURA

1. Prace Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych Politechniki Śląskiej (1952 - 55) — nie publikowane.
2. Paluch J. i Szymkiewicz A., 1956: Sanitarny stan bakteriologiczny źródlisk rzeki Wisły na zboczach Baraniej Góry, *Acta Microbiol. Polon.*, 5:197.
3. Paluch J., Radecka S., Filipowicz J. i Burmecha H., 1956: Stan bakteriologiczny wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze w 1952 i 1953 r. *Biul. Zakł. Biol. Stawów PAN.*
4. Paluch J., Radecka S., Zdybiewska M. i Filipowicz J., 1956: Charakterystyka mikrobiologiczna wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze przeznaczonego dla celów wodociągowych. *Acta Microbiol. Polon.*, 5:173.

J. Paluch, S. Radecka und *J. Filipowicz*

DER SANITÄTSZUSTAND DES OBERLAUFES DER WISŁA UND IHRER NEBENFLÜSSE, SOWIE DES ZUÜBERFLUTENDEN GEBIETES BEI GOCZAŁKOWICE

Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit dem Bau eines Wassersammelbeckens für die Wasserversorgung der Bevölkerung und Industrie von Oberschlesien bei Goczałkowice, wurden in den Jahren 1953 - 1954 sechsmalig bakteriologische Untersuchungen des Oberlaufes der Wisła und ihrer Nebenflüsse, sowie von Wassern im Gebiet des Staubeckens durchgeführt. Die angeführten teilweisen Untersuchungsergebnisse zeigen den bakteriologischen Sanitätszustand der zur Füllung des Beckens vorgesehenen Wässer.

Die sanitäre bakteriologische Analyse wurde nach der Methodik des Staatlichen Hygieneinstitutes durchgeführt, unter Bestimmung der Keimzahl von 1 ml (ccm) Wasser auf Fleischextrakt-Pepton-Agar nach 24 ± 2 Stunden bei $37° \pm 1°$, auf Fleischextrakt-Pepton-Gelatine nach 48 ± 3 Stunden bei $20° \pm 1°$, sowie des Colititers und der Colitype. Die Wasserproben wurden an 31 Stellen des Flusses Wisła von den Quellen bis Nowy Bieruń unterhalb des Staudammes, sowie an 44 Stellen an den Nebenflüssen, Mühlbächen, Bächen, Fischteichen, stehenden Wässern auf dem gesammten Zuflussgebiet des Staubeckens, welches eine Fläche von fast 680 km² umfasst, entnommen (Zeichnung 1 u. 2).

Das Wasser der Wisła enthält schon von den Quellen ab, wie festgestellt wurde, Verunreinigungen mit Substanzen, welche einen guten Nährboden für Bakterien bilden. Die Bakterienzahl wächst flussabwärts der Biała und Czarna Wisełka durch Zufluss von Abwässern der dort gelegenen Ortschaften. Durch die Stauung des Oberlaufs der Wisła mittels Dammes im Retentionsbecken von Czarne fällt die Bakterienzahl rapid ab, was die früheren Resultate von Paluch und Mitarbeitern bestätigt. Im weiteren Lauf der Wisła verunreinigen die Siedlungen Wisła, Ustroń und Skoczów mit Industrieanlagen den Fluss immer stärker, wodurch die Bakterienzahl im ml von 50 bis 100 im Quellgebiet auf 142 000 (26.5.1954 im Mittellauf) und 3000 (5.8.1954 Mittellauf) in Skoczów ansteigt. Von Skoczów bis Strumień fällt die Keimzahl auf Agar bis 235 infolge von Selbstreinigungsprozessen des Wassers. Vom Städtchen Strumień an bis zum Anfang des Ueberflutungsgebietes steigt die Keimzahl des Wisławassers von Neuem an und zeigt im Staubeckengebiet selbst den schlechtesten bakteriologischen Wasserzustand (15 400 Keime im 1 ml Wasser im August 1954).

Die Nebenflüsse der Wisła und andere in das im Bau befindliche Staubecken mündende Wässer führen eine hohe Bakterienzahl mit, ebenso wie die auf dem Ueberflutungsgebiet vorhandenen Wässer (von 200 bis 42 000 Keime im 1 ml Wasser auf Agar, je nach der Herkunft der Probe).

Der Colititer in der Wisła und ihren Nebenflüssen betrug durchschnittlich von 0,01 bis 10, wobei in vielen Fallen der Darmtyp *Escherichia coli* auftritt. In der Mehrzahl der Fälle wurde jedoch *Esch. intermedium* und *Aerobacter aerogenes* festgestellt.

Es ist zu erhoffen, dass durch die Stauung des Flusslaufes der Wisła mittels des Staudammes von Goczałkowice die Keimzahl des Wassers stark erniedrigt Mehrzahl der Fälle wurde jedoch *Esch. intermedium* und *Aerobacter aerogenes* Typus feststellen konnten.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 197—200

J. Paluch i *A. Szymkiewicz*

STAN BAKTERIOLOGICZNY ŹRÓDLISK RZEKI WISŁY NA ZBOCZACH BARANIEJ GÓRY

Z Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych i Katedry Technologii Wody i Ścieków Politechniki Śląskiej w Gliwicach

W maju 1953 r. rozpoczęto badania wód górnego biegu rzeki Wisły i jej dopływów w związku z budową powierzchniowego zbiornika wodnego w Goczałkowicach, mającego zasilać wodociągi śląskie. Badania te objęły stwierdzenie stanu chemicznego, biologicznego i mikrobiologicznego tych wód oraz innych występujących na terenie zalewu a mających zasilać budowany zbiornik. Miały one na celu prześledzenie ewentualnych zmian jakości i stanu wody, flory i fauny oraz mikroflory wodnej w czasie napełniania zbiornika i w następnych okresach jego istnienia.

Badania przeprowadzone w roku 1953 i 1954 (Paluch, Radecka i Filipowicz 1956) wykazały dosyć znaczne zanieczyszczenie wód Wisły nawet w jej górnym biegu w pobliżu źródlisk. I tak np. w Czarnej Wisełce poniżej schroniska turystycznego na Baraniej Górze dnia 18.VIII. 1953 r. ilość bakterii (na agarze mięsno-peptonowym) wynosiła 2900, zaś 5.VIII.1954 r. — 1450 na 1 ml wody. Również posiewy na żelatynie mięsno-peptonowej wykazały dużą ilość bakterii. Podobnie rzeka Biała Wisełka u podnóża Baraniej Góry wykazała na agarze mięsno-peptonowym 250 bakterii w 1 ml wody w 1953 r., a 650 w 1954 r. Miano *E. coli* tych wód wynosiło 5 i 10.

W wyniku tego silnego zanieczyszczenia obu rzek w pobliżu ich źródlisk wykonano analizę mikrobiologiczną źródlisk Wisły wypływających ze zbocza Baraniej Góry. Analizę tę przeprowadzono z punktu widzenia sanitarnego, tj. określono ilości kolonii bakteryjnych wyrosłych na agarze mięsno-peptonowym po 96 + 3 godzinach i żelatynie, oraz oznaczono miano i typ *E. coli* według metodyki Państwowego Zakładu Higieny (1934).

Niezależnie od tych oznaczeń przeprowadzono identyfikację niektórych szczepów bakteryjnych wyizolowanych z poszczególnych źródełek, a otrzymanych na agarze.

Ogółem poddano badaniu 9 źródełek (3 źródła Czarnej Wisełki powyżej schroniska turystycznego i 6 źródeł Białej Wisełki przy partostradzie biegnącej od szczytu Baraniej Góry). Identyfikację niektórych szczepów przeprowadzono tylko w 5 źródełkach Białej Wisełki.

Próbki pobierano dnia 10.VIII.1954 r. przy dużym zachmurzeniu, 2 - 3 godziny po nagłym ulewnym deszczu, jak też w czasie deszczu. Temperatura powietrza wynosiła 12,0°, zaś temperatura wody w poszczególnych źródełkach wahała się od 8,0 do 9,0°. Próbki wody w dwóch powtórzeniach pobierano do jałowych flaszek z doszlifowanym korkiem, pojemności 50 ml. Próbki te wysiano na standardowe podłoża tego samego dnia, około 6 godzin po pobraniu.

Źródliska Białej Wisełki, idąc od szczytu Baraniej Góry w dół nartostradą, wykazały miano *coli* powyżej 10 i 10, przy czym bakterie zidentyfikowano jako *E. citrovorum*. Podobne miano *E. coli* stwierdzono w źródliskach Czarnej Wisełki. W dwóch źródłach wynosiło ono powyżej 10. w trzecim 10, przy czym występował tu również typ *citrovorum*. Ogólną ilość kolonii bakterii na agarze mięsno-peptonowym po 24 ± 2 godz. hodowli w temperaturze 37° ± 1° oraz po 96 ± 3 godz. hodowli w temp. 27° ± 1° w źródliskach Białej Wisełki przedstawiono w tabeli I.

Tabela I

Ilość bakterii w poszczególnych źródliskach Białej Wisełki
Die Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers einiger Quellbächen der Biała Wisełka

Źródełko die Quelle	Ilość bakterii w przeliczeniu na 1 ml wody po: Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers	
	24 godz. w 37°	96 godz. w 27°
I	50	550
II	10	340
III	40	50
IV	180	1 080
V	120	620
VI	10	170

Posiewy na żelatynie wykazały dużą ilość bakterii proteolitycznych. W posiewach źródełek I, II, III, IV i V żelatyna została upłynniona, tak że liczenie kolonii było niemożliwe. W źródełku VI liczba bakterii proteolitycznych była znacznie mniejsza i wynosiła 30 w 1 ml badanej wody.

Ogólną ilość bakterii w 1 ml wody w źródełkach Czarnej Wisełki podaje tabela II.

Tabela II

Ilość bakterii w niektórych źródełkach Czarnej Wisełki
Die Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers einiger Quellbächen der Czarna Wisełka

Źródełko die Quelle	Ilość bakterii w przeliczeniu na 1 ml wody po: Bakterienzahl pro 1 ml des Wassers	
	24 godz. w 37°	96 godz. w 27°
I	65	80
II	100	470
III	60	250

Posiewy z wszystkich trzech badanych źródlisk Czarnej Wisełki upłynniały żelatynę.

Duże zanieczyszczenie w tym czasie badanych źródlisk można tłumaczyć zmywaniem przez wody deszczowe zbocza Baraniej Góry, terenu często uczęszczanego przez turystów.

Badania diagnostyczne bakterii wyizolowanych ze źródełek Białej Wisełki przeprowadzono uwzględniając tylko bakterie tlenowe wyrosłe na agarze mięsno-peptonowym. Prawdopodobnie można się spodziewać, że ilość bakterii beztlenowych może być niewielka w wodzie źródlanej, między innymi na skutek dużego napowietrznienia wody o dużym spadku, nieznacznej głębokości, małej zawartości substancji organicznych itp.

Identyfikację przeprowadzono według B e r g e y a (1948) stosując metody standardowe (Manual of methods for pure culture... 1952). Stwierdzono występowanie następujących rodzajów bakterii: *Achromobacter, Micrococcus, Sarcina, Flavobacterium, Bacterium, Bacillus, Clostridium, Nocardia.*

Spośród wyosobnionych 15 szczepów większość nie przetrwalnikowała (4 gatunki przetrwalnikujące), jak również w większości były to bakterie nieruchliwe; 9 szczepów okazało się gramdodatnich, 6 zaś gramujemnych. Wzrost uzyskano bardzo dobry na agarze, a także na bulionie (z wyjątkiem *Micrococcus candidus* i *Clostridium foetidum*) i ziemniaku.

Własności proteolityczne oraz hydrolizę skrobi z powstawaniem cukrów stwierdzono tylko u 4 szczepów. Zdolność denitryfikacji wykryto u 5 szczepów. Żaden z badanych szczepów nie wytwarzał siarkowodoru ani indolu.

Większa część zidentyfikowanych szczepów — to bakterie występujące zarówno w glebie, jak i w wodzie, co tłumaczyć można warunkami atmosferycznymi w czasie pobierania próbek. Wszystkie przebadane szczepy były saprofitami. Nie wykryto bakterii charakterystycznych tylko dla środowiska wodnego.

Opisana mikroflora nie daje typowo charakterystycznego obrazu źródełek, uwzględniając jednak, że deszcze są częstym zjawiskiem w rejonie Baraniej Góry, może być brana pod uwagę przy ocenie źródlisk rzek biorących początek w górach.

Praca ta nie jest jeszcze całkowicie zakończona. Przewiduje się dalsze pobieranie próbek wody z tych i innych jeszcze źródlisk rzeki Wisły w okresie letnim, przy stałej pogodzie. Pozwoli to prawdopodobnie na dokładniejsze scharakteryzowanie mikroflory bakteryjnej bytującej w tych źródełkach.

LITERATURA

1. P a l u c h J., R a d e c k a S. i F i l i p o w i c z J., 1956: Stan sanitarny górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach, *Acta Microbiol. Polon.*, 5:187.
2. Państwowy Zakład Higieny, 1934: Ujednostajnienie metody bakteriologicznego badania wody. Warszawa.
3. B e r g e y, 1948: Manual of Determinative Bacteriology, London.
4. Manual of methods for pure culture study of bacteria, 1952. Geneva, N. Y., Society of American Bacteriologists.

J. Paluch und *A. Szymkiewicz*

DER BAKTERIOLOGISCHE SANITÄTSZUSTAND DES WISŁAQUELLGEBIETES AN DEN ABHÄNGEN DER BARANIA GÓRA

Zusammenfassung

Im August 1954 wurde Wasser aus den neun Quellbächen der Flüsse Biała Wisełka und Czarna Wisełka der Untersuchung unterzogen. Es wurde hierbei die sanitäre bakteriologische Analyse nach der Methodik des Staatlichen Hygieneinstitutes, sowie die teilweise Identifizierung der aëroben Bakterien auf Fleischextrakt-Pepton Agar durchgeführt. Die Wasserproben wurden aus den Quellen während eines unerwarteten Regengussen entnommen. Die Gesamtkeimzahl (pro 1 ml) nach 24-stündiger Inkubation bei 37° auf Fleischextrakt-Pepton Agar betrug im Quellwasser der Biała Wisełka von 10 bis 180, im Quellwasser der Czarna Wisełka 60 bis 100. Fleischextrakt-Pepton Gelatine war grösstenteils verflüssigt.

Der Colititer betrug 10 und mehr als 10.

Die starke Verunreinigung der untersuchten Quellwässer zu dieser Zeit ist dadurch zu erklären, dass die Regenwässer die Hänge der von Touristen viel besuchten Barania Góra bespülen.

Von den auf Fleischextrakt-Pepton Agar erhaltenen Keimen wurden 15 Bakteriengattungen abgesondert und identifiziert, welche den Gattungen *Achromobacter, Micrococcus, Sarcina, Flavobacterium, Bacterium, Bacillus, Clostridium* und *Nocardia* angehörten.

Die Mehrzahl der identifizierten Keime enthielt Bakterien, welche im Boden und Wasser auftreten, was durch die Wetterverhältnisse während der Probenahme zu erklären ist. Es wurden keine nur für das Wassermilieu charakteristischen Bakterien aufgefunden. Die beschriebene Mikroflora ergibt kein typisch-charakteristisches Bild für Flussquellen; wenn man jedoch berücksichtigt, dass Regenfälle im Gebiet der Barania Góra recht häufig sind, kann diese Mikroflora bei der Beurteilung von Quellbächen, deren Ursprung im Gebirge liegt, in Betracht gezogen werden. Weitere eingehende Untersuchungen sind im Gange.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 201—205

W. Macander

BADANIA NAD PRĄTKAMI KWASOOPORNYMI WYSTĘPUJĄCYMI W WODZIE RZECZNEJ, DO KTÓREJ WPŁYWAJĄ ŚCIEKI PO PRZEJŚCIU PRZEZ OCZYSZCZALNIĘ

Ze Stacji Sanitarno-epidemiologicznej w Warszawie

Niniejsza praca jest fragmentem badań nad zanieczyszczeniem wody rzecznej prątkami kwasoopornymi.

Zagadnienie występowania prątków kwasoopornych, a szczególnie prątków gruźlicy, w rzekach i ściekach jest bardzo ważne ze względów epidemiologicznych. Niestety problem ten nie jest wystarczająco opracowany zarówno w literaturze krajowej jak i zagranicznej. Liczne prace naukowe z zakresu badań wody dotyczą przede wszystkim wykrywania pałeczek duru, durów rzekomych, czerwonki, oznaczania miana *coli*, stopnia zanieczyszczenia biologicznego, składu chemicznego wody itp. (Dzierzgowski 1947, Gądzikiewicz 1949, Kerski 1953, Przyłęcki 1954, Seperówna 1935). Z prac naukowych (z literatury mi dostępnej) poświęconych zagadnieniom obecności prątków kwasoopornych w ściekach i rzekach na uwagę zasługują prace: Gaustada (1947), Gerbeau (1938), Jensena (1954), Muscholda (1900), Żebrowskiego (1955).

Jensen (1954) badał ścieki pięciu miast duńskich, w których znajdują się sanatoria gruźlicze i stwierdził w nich obecność prątków gruźlicy. Ten sam autor zaleca nie tylko sterylizację plwociny chorych na gruźlicę przed włączeniem do ogólnej sieci ścieków, ale i sterylizację fekalii. Muscholda (1900) stwierdza na podstawie licznych obserwacji, że prątki gruźlicy w ściekach zachowują swoją żywotność i zjadliwość przez szereg miesięcy, nawet w szlamie wysuszonym. Żebrowski (1955) wyhodował liczne szczepy saprofitycznych prątków kwasoopornych z materiału pobranego sprzed krat osadnika u wylotu głównego kanału ściekowego oraz z osadnika I, II i III basenu oczyszczalni ścieków miasta Otwocka. Gaustad (1947) przytacza fakt zakażenia trojga dzieci prątkami gruźlicy na skutek napicia się wody rzecznej, w wypadku załamania się lodu na rzece i wpadnięcia dzieci do wody. Do rzeki tej doprowadzane były ścieki z pobliskiego sanatorium dla chorych na gruźlicę.

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie faktu, czy w wodzie rzecznej, do której wpływają ścieki po przejściu przez oczyszczalnię ścieków, znajdują się prątki kwasooporne zjadliwe i niezjadliwe, oraz czy wieloważy bakteriofag saprofitycznych prątków kwasoopornych działa rozpuszczająco na prątki niezjadliwe wyhodowane z wody.

BADANIA WŁASNE

Przebadano 22 próbki wody rzecznej w okresie letnio-jesiennym 1954 roku. Próbki wody pobierano z odległości kilkunastu kilometrów od oczyszczalni ścieków zainstalowanych w osiedlu sanatoriów gruźliczych. Próbki wody pobierano z różnych miejsc badanego odcinka rzeki. Wodę do badań dostarczano w sterylnych litrowych butelkach z doszlifowanymi korkami. Do badań zużywano cały litr wody.

Wszystkie próbki wody przebadano stosując następującą metodę określania obecności prątków: 1) bezpośrednie badania mikroskopowe, 2) homogenizacja, 3) flotacja, 4) posiewy: a) makrohodowla, b) mikrohodowla, 5) próby biologiczne, 6) bakteriofagia. Każdą próbkę wody zagęszczano przy pomocy świecy Berkefelda. Materiał zagęszczony w postaci osadu przygotowywano do posiewu na pożywki i do prób biologicznych metodą homogenizacji. Przygotowany materiał z każdej próbki wody posiewano na pożywki stałe jajowe Petragnaniego, Löwensteina i wykonywano próby biologiczne. Na każdą próbę biologiczną zużywano po dwie świnki morskie. Świnkom morskim szczepiono podskórnie w okolicy gruczołu pachwinowego 1 ml zawiesiny. Z resztek materiału przygotowywano rozmazy do badań bezpośrednich i rozmazy na szkiełkach do mikrohodowli metodą Pryce'a (według Bernard i Kreis 1949). Preparaty bezpośrednie, preparaty z hodowli i materiału sekcyjnego barwiono metodą Ziehl-Neelsena. Posiewy wstawiano do cieplarki o temperaturze 37°, a wyniki odczytywano: z mikrohodowli po 12 - 14 dniach, z posiewu na pożywkach stałych po 4 - 8 tygodniach, próby biologiczne po 4, 8 i 12 tygodniach obserwacji.

Na 22 próbki wody rzecznej uzyskano przypadków dodatnich: metodą badań bezpośrednich — 0, metodą homogenizacji — 12, metodą flotacji — 12, metodą posiewu — 12, metodą mikrohodowli — 10, metodą prób biologicznych — 2.

Przebadano zjadliwość szczepów wyhodowanych na pożywkach stałych, stosując próby biologiczne na królikach i świnkach uprzednio tuberkulinizowanych oraz próbę mikrohodowli szkiełkowej metodą Pryce'a na pożywce Youmansa. W tym celu sporządzono zawiesiny 12 wyizolowanych szczepów prątków kwasoopornych. Zawiesinę bakteryjną każdego szczepu przygotowano dla świnek morskich w 4 dawkach: 0,001, 0.01, 0,1, i 1 mg/ml wilgotnej masy prątków. Królikom podano zawiesinę bakteryjną 12 szczepów w 2 dawkach: 0,1 i 1 mg/ml wilgotnej masy prątków. Na każdą dawkę zawiesiny bakteryjnej zużywano po 2 świnki morskie i po 1 króliku. Świnkom szczepiono 1 ml zawiesiny bakteryjnej podskórnie w okolicy gruczołu pachwinowego. Króliki zakażano dożylnie (żyła brzeżna ucha) 1 ml zawiesiny bakteryjnej. Świnki morskie pozostałe przy życiu usypiano i sekcjonowano po 4 - 8 tygodniach, króliki po 4 - 12 tygodniach obserwacji. Z resztek zawiesin bakteryjnych o największym zagęszczeniu prątków kwasoopornych (1 mg/ml) przygotowywano mikrohodowlę szkiełkową.

Na podstawie reakcji szczepionych zwierząt laboratoryjnych i na podstawie mikrohodowli szkiełkowej, dającej charakterystyczny wzrost prątków kwasoopornych niezjadliwych (wzrost kolonii w postaci gniazd) i zjadliwych (wzrost kolonii w postaci rozgałęzień głowy meduzy), stwierdzono, że spośród 12 szczepów wyhodowanych z wody rzecznej 2 szczepy wykazały cechy zjadliwych prątków kwasoopornych w mikrohodowli. Te same 2 szczepy wywoływały zmiany gruźlicze (bez względu na dawkę) w gruczołach pachwinowych, śledzionie i wątrobie u świnek morskich.

Króliki zaszczepione tymi samymi szczepami reagowały minimalnie na zakażenie tylko w pierwszych tygodniach (traciły na wadze), a po 4 - 6 tygodniach wracały do zdrowia. Następne 10 szczepów wykazało cechy prątków kwasoopornych niezjadliwych w mikrohodowli. Szczepy te w dawkach większych (0,1 i 1 mg/ml) wywoływały tylko okresowe, nieznaczne zmiany w gruczołach pachwinowych świnek morskich. Zmiany te nikły po 3 - 4 tygodniach. U królików szczepionych tymi samymi szczepami nie stwierdzono nawet przejściowych zaburzeń w organizmie.

Przebadano *in vitro* i *in vivo* jeden szczep saprofitycznych prątków kwasoopornych wyhodowanych z wody rzecznej, w celu stwierdzenia siły litycznej znanego bakteriofaga wieloważnego saprofitycznych prątków kwasoopornych na dany szczep (M a c a n d e r 1954). W tym celu przygotowano zawiesinę danego szczepu (1 mg ml wilgotnej masy prątków). Sześć świnek zaszczepiono podskórnie w okolicy gruczołu pachwinowego 1 ml zawiesiny. Po 10 - 12 dniach od momentu zakażenia wystąpiło obrzmienie gruczołów i perforacja ropna. Wówczas zastosowano u 3 świnek morskich leczniczo bakteriofaga wieloważnego o znanej mocy litycznej. Świnkom podawano podskórnie w okolicę gruczołu pachwinowego w ciągu trzech dni różne dawki wieloważnego bakteriofaga: pierwsza świnka otrzymała dawkę 0,5 ml, druga 1 ml, trzecia 2 ml. Świnki leczone bakteriofagiem dochodziły do zdrowia o 10 dni wcześniej niż świnki nieleczone. Po pięciu tygodniach obserwacji wykonano sekcję wszystkich świnek. Przy sekcji nie stwierdzono zmian gruźliczych, a miejsca po perforacji zabliźniły się. W preparatach z materiału sekcyjnego nie napotkano prątków kwasoopornych. Badany szczep wysiany na agar i bulion zwykły dał wzrost w postaci kożuszka pomarszczonego, suchego, o zabarwieniu jasnoróżowym. Trzydniową hodowlę bulionową posiano na płytce Petriego obok saprofitycznych szczepów *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. Rabinowitsch*. Na każdy szczep naniesiono dużą kroplę wieloważnego bakteriofaga. Hodowlę wstawiono do cieplarki o temperaturze 37° na przeciąg 3 dni. Po trzech dniach inkubacji stwierdzono silne działanie bakteriofaga wieloważnego na szczepy *M. smegmatis*, *M. phlei* i *M. Rabinowitsch*, a słabsze działanie w stosunku do szczepu wyhodowanego z wody. Płytkę zmyto bulionem i wodą peptonową, dodano świeżych szczepów saprofitycznych, mieszaninę pozostawiono w cieplarce w temperaturze 37° na 12 godzin. Następnie mieszaninę przesączono przez świecę Chamberlanda L$_3$. Wysiano na płytkę agarową Petriego świeżą hodowlę szczepu z wody oraz hodowlę szczepów saprofitycznych i naniesiono po kropli przesączu, wstawiając płytkę do cieplarki o temperaturze 37° na 3 dni. Całkowitą lizę szczepu wyhodowanego z wody uzyskano dopiero po czterech takich pasażach.

Występowanie zjadliwych szczepów *M. tuberculosis* w wodzie rzecznej zmusza nas do bliższego zainteresowania się problemem oczyszczania ścieków ośrodków sanatoryjnych dla chorych na gruźlicę przed włączeniem ich do ogólnej sieci kanalizacyjnej miast. J e n s e n (1954) uważa, że stosowanie odpowiednich środków dezynfekcyjnych i sterylizujących plwocinę i fekalia chorych na gruźlicę nie nastręcza większych trudności, wobec czego Komisja Międzynarodowa winna opracować jednolitą technikę niszczenia prątków w ściekach.

WNIOSKI

1. W wodzie rzecznej, do której wpływają ścieki po przejściu przez oczyszczalnię, znaleziono prątki kwasooporne saprofityczne i zjadliwe.

2. Na 22 próbki wody rzecznej stwierdzono w 10 przypadkach prątki saprofityczne, w 2 — prątki kwasooporne zjadliwe typu ludzkiego.

3. Bakteriofag wieloważny saprofitycznych prątków kwasoopornych, podany w różnych dawkach świnkom morskim zakażonym szczepami saprofitycznych prątków kwasoopornych, skrócił okres zdrowienia świnek leczonych o 10 dni w stosunku do świnek nieleczonych.

LITERATURA

1. Dzierzgowski S., 1947: W sprawie oczyszczania wód odpływowych. Warszawa.
2. Gerbeau A., 1947: Contribution a l'étude des eaux d'alimentat de la ville de Marseille. Marseille 1938.
3. Gaustad V., 1947: *Acta Tuberc. Scand.*, **21**: 281.
4. Gądzikiewicz W., 1949: Metodyka badań higienicznych wody, powietrza i gruntu, Warszawa.
5. Jensen K., 1954: Presence and destruction of Tubercle Bacilli in Sewage. *Bull. World Health Org.*, **10**: 171.
6. Kerski J., 1953: Sanitarno przeciwepidemiologiczne zabezpieczenie budowy zbiornika wodnego w Goczałkowicach. Warszawa.
7. Macander W., 1954: Badania nad działaniem bakteriofaga na saprofityczne prątki kwasooporne. *Gruźlica*, Nr 10.
8. Morzycki J. i Morzycka M., 1948: Zanieczyszczenia bakteriologiczne wody morskiej Zatoki Gdańskiej. *Przegląd Epid.*, Nr 3.
9. Muschold P., 1900: *Arb. Gesundheitsamte Berl.*, **17**: 56.
10. Przyłęcki H., 1954: Badania wody, ścieków i osadów w zakresie techniki sanitarnej. T. 1. Warszawa. PWT.
11. Seperówna J., 1935: Badania nad wykrywaniem duru i paratyfusów w wodzie. *Med. Dośw. i Społ.*, **19**.
12. Żebrowski T., 1955: Gruźlica — Spostrzeżenia nad działaniem uodparniającym saprofitycznych prątków kwasoopornych. *Gruźlica*, Nr 9.

В. Мацандер

ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ В РЕЧНОЙ ВОДЕ КУДА СПЛЫВАЮТ ОЧИЩЕННЫЕ СТОЧНЫЕ ВОДЫ

Резюме

В осенне-летний период 1954 г. проведены исследования речной воды, куда сплывали предварительно очищенные сточные воды. Кислотоустойчивые бактерии были найдены в 12 пробах на 22 анализируемые методом флотации, гомогенизации и посева, а в 10 пробах при помощи микробиологического метода.

В 2 случаях обнаружены вирулентные палочки при помощи прививки опытных животных. Применяя микрометод Прайса, только у 2 штаммов обнаружено рост, характерный для вирулентных кислотоустойчивых палочек. Подкожная прививка морских свинок в окрестностях паховой железы 1 мл бактерийной

взвеси вызвала появление определенных туберкулезных изменений в селезенке и паховой железе. Взвеси приготовлялись из влажной массы кислотоустойчивых палочек в количестве 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мг/мл.

В препаратах, взятых из трупов привитых морских свинок, убитых спуст 4 недели или павших в течение 6 - 7 недель, установлено наличие туберкулезных палочек. Внутривенная прививка дозами 0,1 и 1 мг/мл в 1 мл бактерийной взвеси не привела к появлению туберкулезных изменений у 4 - 12-недельных кроликов. Рассматриваемые штаммы зачислены к *Mycobacterium tuberculosis v. hominis*. Гнойные очаги, возникшие у морских свинок в тестах инъекции кислотустойчивыми палочками, выращенными из воды, после применения поливалентного бактериофага исчезали на 10 дней раньше, чем у контрольных свинок. В исследованиях *in vitro* установлено литическое действие поливалентного бактериофага сапрофитических кислотоустойчивых палочек на сапрофитический штамм выращенный из речной воды.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 207—210

N. Balicka i *J. Sobieszczański*

ŻYWOTNOŚĆ *ESCHERICHIA COLI* W GLEBIE NAWADNIANEJ ŚCIEKAMI MIEJSKIMI

Z Zakładu Mikrobiologii Rolnej WSR we Wrocławiu

Wykorzystanie ścieków miejskich dla podniesienia produkcji rolniczej jest uzasadnione z punktu widzenia ekonomicznego. Nasuwają się natomiast wątpliwości, czy nie jest to połączone z możliwością infekcji ludzi i zwierząt. Niebezpieczeństwo infekcji może istnieć w wypadku, jeżeli pole irygacyjne nie spełnia należycie swojej roli jako filtr oraz gdy drobnoustroje chorobotwórcze ze ścieków pozostają czynne w glebie, skąd mogą się dostawać do płodów rolnych.

W referowanej pracy próbowano określić, jak długo zachowują swoją żywotność drobnoustroje wprowadzone do gleby ze ściekiem. Jako wskaźnik biologicznego zanieczyszczenia została użyta *E. coli*. Jej obecność w glebie i w wodzie oznaczano metodą fermentacyjną na pożywce płynnej Bulira.

W tym celu założono doświadczenia: 1) wegetacyjne w wazonach i 2) w warunkach laboratoryjnych, w cylindrach.

I. Doświadczenie wegetacyjne przeprowadzono w wazonach doświadczalnych napełnionych glebą próchniczną z dodatkiem piasku. Wazony trzymano w otwartej hali wegetacyjnej. W wazonach posadzono kapustę, kupkówkę i zachowano jeden wazon bez roślin. Wybrana roślina nadaje się do uprawy na polach irygacyjnych. Doświadczenie przeprowadzono w dwu seriach: 1) z roślinami dwuletnimi, 2) z roślinami jednorocznymi.

Serię pierwszą podlano dnia 3.V.1954 r. 300 ml ścieku surowego na wazon. Seria druga podlana została dnia 8.V.1954 r. taką samą ilością ścieku. Miano *coli* w użytym ścieku wynosiło 10^{-5}. Miano *coli* oznaczano początkowo co tydzień, następnie po upływie miesiąca. Zmiany miana *coli* w glebie w miarę upływu czasu przedstawiają tabele I i II.

Miano *coli* w glebie kontrolnej nie podlewanej ściekiem utrzymywało się pod roślinami i bez roślin na poziomie 10^{-2} przez cały czas trwania doświadczenia.

Przedstawione w powyższych zestawieniach wyniki wskazują, że po upływie 6 tygodni ilość *E. coli* w glebie pod roślinami wróciła do stanu jaki był przed podlaniem wazonów ściekiem (miano 10^{-2}). W glebie bez roślin miano *coli* obniżyło się do 10^{-2} później — stwierdzone to zostało dopiero po 2 i pół miesiącach. W glebie nie podlanej miano *coli* wynosiło stale 10^{-2}.

II. W warunkach laboratoryjnych próby przeprowadzono w metalowych, wyparafinowanych cylindrach, o pojemności 1500 ml, napełnionych różną glebą: 1) piaszczystą, 2) lekką próchniczną i 3) madą. Do cylindrów z glebą o wyrównanej wilgotności wprowadzono po 20 miliardów ko-

Tabela I

Miano *coli* w glebie podlanej ściekiem
(doświadczenie wazonowe, seria I)

Титр *coli* в почве (вазонный опыт, серия I)

Obiekt Комбинация	Miano *coli* w glebie — Титр *coli* в почве					
	przed podlaniem перед орошением	po podlaniu — после орошения				
		3.V.	11.V.	18.V.	15.VI.	16.VIII.
Kapusta Капуста	10^{-2}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}
Kupkówka Ежа сборная	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}
Bez roślin Без растений	10^{-2}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}

Tabela II

Miano *coli* w glebie podlanej ściekiem
(doświadczenie wazonowe, seria II)

Титр *coli* в почве (вазонный опыт, серия II)

Obiekt Комбинация	Miano *coli* w glebie — Титр *coli* в почве				
	Przed podlaniem Перед орошением	Po podlaniu — После орошения			
	3.V.	11.V.	18.V.	15.VI.	16.VIII.
Kapusta Капуста	10^{-2}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}
Kupkówka Ежа сборная	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-2}
Bez roślin Без растений	10^{-2}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}

Tabela III

Miano *coli* w glebie (doświadczenie laboratoryjne)

Титр *coli* в почве (опыт в лабораторных условиях)

Gleba Почва	Miano *coli* w glebie — Титр *coli* в почве						
	Przed podlaniem Перед орошением	po podlaniu после орошения					
	18.II.	19.II.	1.III.	10.III.	28.III.	21.IV.	29.IV.
Piaszczysta Песчаная	10^{-1}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-1}
Próchniczna Садовая	10^{-2}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
Mada Аллювиальная	10^{-3}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}

mórek *E. coli* w formie zawiesiny czystej kultury. Po 24 godzinach cylindry podlano czystą wodą w ilości przekraczającej pojemność wodną gleby, tak aby uzyskać odciek wody. W glebie i w odcieku co tydzień oznaczano miano *coli*. Wyniki podane są w tabeli III.

Jak widzimy z zestawienia, miano *coli* w glebie próchnicznej i wodzie zmniejszyło się po upływie około 70 dni do 10^{-2}, to znaczy do pierwotnego poziomu. W glebie piaszczystej okres ten był nieco krótszy i wynosił około 62 dni. Odciek wody z gleby, niezależnie od jej rodzaju, nie zawierał *E. coli* lub wykazywał miano 10^{-1}. Zjawisko to można tłumaczyć tym, że 16-centymetrowa warstwa gleby, znajdująca się w cylindrze, stanowiła wystarczający filtr dla oczyszczenia wody od zawieszonych w niej komórek *E. coli*.

III. Próbę zbadania procesu samooczyszczenia się gleby przeprowadzono również w warunkach naturalnych — polowych. W tym celu skorzystano z doświadczeń prowadzonych przez S. Marcilonka na polach irygacyjnych miasta Wrocławia. Doświadczenie polegało na badaniu wpływu różnych sposobów nawadniania poletek na własności gleby i plony kukurydzy. Miano *coli* określano w glebie oraz w wodzie gruntowej. Poletka nawadniano ściekami miejskimi, oczyszczonymi uprzednio w studni Imhoffa i osadniku. Nawadnianie przeprowadzano: 1) przez deszczowanie i 2) jako nawadnianie wgłębne przez system rurek drenarskich ułożonych na głębokości około 20 cm. Wysokość dawek wody ściekowej była dostosowana do pojemności gleby i wynosiła od 15 do 80 mm ścieku. Miano *coli* w glebie i w wodzie gruntowej określano przed nawodnieniem, po upływie 10 dni i 6 tygodni od chwili ostatniego nawadniania. Miano *coli* w użytym ścieku wynosiło 10^{-5}. Wyniki są przedstawione w tabeli IV.

Tabela IV

Miano *coli* w glebie i w wodzie gruntowej
(doświadczenie polowe)
Титр *coli* в почве и почвенной воде
(полевой опыт)

Metoda nawadniania Способ орошения	Gleba Почва			Woda gruntowa Почвенная вода		
	przed nawodnieniem перед орошением	nawodnienie 10.V. орошение	nawodnienie 18.IX. орошение	przed nawodnieniem перед орошением	nawodnienie 10.V. орошение	nawodnienie 18.IX. орошение
	7.V.	17.V.	3.X.	7.V.	17.V.	3.X.
Nawodnienie: **Орошение:**						
wgłębne **глубинное**	10^{-2}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
deszczowanie **дождевание**	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
Nie nawadniane: **Не орошаемые**						
(kontrolne) **(контроль)**	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}

Z tabeli wynika, że na skutek nawadniania ściekiem miano *coli* w glebie wzrosło (oznaczenie wykonano w 10 dni po nawodnieniu, 17.VI.). Natomiast analiza wykonana 3.X., to jest po upływie 2 tygodni od ostatniego nawodnienia (18.IX.), wykazała miano *coli* takie jak przed pierwszym nawodnieniem w miesiącu czerwcu (10^{-2}). Na wszystkich poletkach widzimy też oczyszczenie ścieku po przefiltrowaniu przez glebę — w wodzie gruntowej na głębokości 60 do 90 cm nie stwierdzono podwyższenia miana *coli*.

Na podstawie przeprowadzonych prób uzyskano następujące wyniki:

1. Po wprowadzeniu do gleby zawiesiny komórek *E. coli* lub ścieku zawierającego bakterie z grupy *coli* obserwowano w niej podwyższenie miana *coli*.

2. W miarę upływu czasu miano *coli* w glebie zaczynało spadać, aż do momentu osiągnięcia poziomu, jaki gleba wykazywała przed podlaniem.

3. W przeprowadzonych doświadczeniach szybciej zachodził spadek miana *coli* w glebie zasianej roślinami, aniżeli w pozbawionej roślinności (doświadczenie wazonowe). W doświadczeniu wazonowym i polowym w glebie obsianej okres ten wynosił około 6 tygodni.

4. Porównując zmiany miana *coli* w różnych rodzajach gleb (doświadczenie laboratoryjne), zanotowano jego szybszy spadek w glebie piaszczystej niż w próchnicznej i w madzie.

5. Woda z zawieszonymi w niej komórkami *E. coli* po przejściu przez warstwę gleby w doświadczeniu laboratoryjnym i polowym zawierała znikomą ilość bakterii z grupy *coli*.

Н. Балицка и М. Собещански

ВЫЖИВАЕМОСТЬ *B. COLI* В ПОЧВЕ. ОРОШАЕМОЙ СТОЧНЫМИ ВОДАМИ

Резюме

В исследованиях проведенных в полевых и лабораторных условиях наблюдалась выживаемость *B. coli* в почве орошаемой сточными водами, или взвесью *E. coli*.

Получены следующие результаты (Таб. I, II, III):

1. Найдено повышение титра *coli* в почве после ее орошения сточными водами.

2. Титр *coli* в почве со временем падает, причем быстрее под растениями (6 недель) чем в необсеянной почве (~2,5 месяца).

3. Титр *coli* падает быстрее в песчаной, чем в аллювиальной или садовой почвах.

4. Сточные воды, профильтрованные через слой земли, являются чистой водой, содержащей минимальное количество *B. coli* (Таб. IV).

M. Możejko

ROZKŁAD ALKALOIDÓW PRZEZ MIKROORGANIZMY GLEBOWE

РАЗЛОЖЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ ПОЧВЕННЫМИ МИКРОБАМИ

Z Zakładu Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie

Wyizolowano z gleby 11 szczepów bakteryjnych zdolnych do rozkładu alkaloidów. Bakterie te mogą korzystać z alkaloidu jako z jedynego źródła azotu i węgla.

Przy użyciu wyizolowanych szczepów uzyskano rozkład następujących alkaloidów: atropiny, akonityny, chininy, kokainy, morfiny, nikotyny, papaweryny i pirydyny.

Mikrobiologiczny rozkład tych alkaloidów może zachodzić także w obecności innych organicznych źródeł azotu i węgla.

Próby klasyfikacji powyższych szczepów wskazywały na to, że są to szczepy w literaturze nie opisane.

A. Joszt i *J. Gańczarczyk*

ODBUDOWA KWASÓW LIGNINOSULFONOWYCH W TLENOWYCH WARUNKACH RZEKI

DONIESIENIE TYMCZASOWE

Z Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Kwasy ligninosulfonowe są zasadniczym składnikiem ścieków, powstających przy produkcji celulozy siarczynowej, i wraz z tymi ściekami dostają się do rzek — odbiorników tych ścieków — gdzie stanowią bardzo uciążliwe zanieczyszczenia (Gańczarczyk 1955).

Proces biologicznej odbudowy kwasów ligninosulfonowych w takich rzekach, zachodzący przy samooczyszczaniu się rzek, nie jest dotychczas w wystarczającym stopniu znany przede wszystkim ze względu na wyjątkowe trudności analityczne przy ilościowym oznaczaniu kwasów ligninosulfonowych w wodzie.

Posługując się dwiema opracowanymi poprzednio przez Gańczarczyka (1955) metodami oznaczania tych substancji, opartymi na efektach barwnych zachodzących przy ich nitrozowaniu (metoda nitrozoligninowa) oraz przy chlorowaniu (metoda chlorowa), badano przebieg odbudowy kwasów ligninosulfonowych w rzece A, będącej odbiornikiem ścieków fabryki celulozy siarczynowej. Pomiary wykonywano na odcinku 21 km biegu rzeki, począwszy od odległości 11 km od ujścia tych ścieków do rzeki, dla zapewnienia pełnego ich wymieszania się z wodą rzeczną (punkt I), do odległości 32 km od tego miejsca (punkt II). Woda rzeczna przebywa badany odcinek w czasie około 8 godzin, płynąc tu ze średnią szybkością około 0.7 m/sek. Średni stosunek objętości przepływów w punkcie I i II wynosi według danych hydrologicznych 0,8.

Na podstawie dotychczasowych wyników pomiarów (tabela I) uzyskanych w części planowanego rocznego okresu doświadczalnego, a mianowicie w comiesięcznych pomiarach w miesiącach od stycznia do lipca 1955 r., stwierdzono, że kwasy ligninosulfonowe ulegają w tej rzece w warunkach aerobowych (60 - 85% nasycenia tlenem) znacznej odbudowie biologicznej. Szybkość tej odbudowy, przy

traktowaniu jej jako reakcji jednocząsteczkowej, wyrazić można stałą reakcji k, która wynosi po przeliczeniu na temperaturę 20° i dobowe określenie czasu:

przy pomiarach metodą nitrozoligninową $1{,}39 \pm 25\%$
przy pomiarach metodą chlorową $1{,}61 \pm 34\%$

Wielkości te są o wiele większe od podawanych w literaturze analogicznych stałych dla odbudowy BZT ścieków miejskich, wynoszących co najwyżej 0,5 (zwykle 0,1 - 0,2). Nadwyzka ta jest sprzeczna z powszechnie panującą opinią o szczególnej odporności kwasów ligninosulfonowych na odbudowę biologiczną, lecz potwierdza pogląd sprecyzowany poprzednio przez Joszta (1954).

Ponadto zaobserwowano wzrost rozbieżności oznaczeń kwasów ligninosulfonowych metodą nitrozoligninową i metodą chlorową, w miarę przebiegu reakcji odbudowy, a mianowicie obniżenie wielkości oznaczeń metodą chlorową w stosunku do nitrozoligninowej. Szybkość wzrostu tej rozbieżności na badanym odcinku, przy założeniu jednocząsteczkowego przebiegu tego zjawiska (po przeliczeniu na temperaturę 20° i dobowe określenie czasu), wyraża się w naszych pomiarach stałymi szybkości reakcji w zakresie od 0,25 - 2,55.

Z analogicznym zjawiskiem spotkał się Gańczarczyk już wcześniej przy oznaczaniu tymi metodami analitycznymi małodrobinowej części kwasów ligninosulfonowych (kwasy β-ligninosulfonowe), substancji zapewne o niepełnym charakterze ligninowym. Dalsze śledzenie tego zjawiska może przyczynić się do poznania chemizmu biologicznej odbudowy kwasów ligninosulfonowych.

Omawiane badania są dalej prowadzone i po ukończeniu będą tematem osobnej publikacji, ujmującej pełny roczny cykl pomiarów.

Tabela I

Zawartość kwasów ligninosulfonowych w wodzie rzeki A
Concentration of lignosulfonic acids in river water

Nr próbki Sample N°	Temperatura wody w °C Temperature of water	Zawartość kwasów ligninosulfonowych w mg/l Concentration			
		punkt I		punkt II	
		metoda nitrozoligninowa	metoda chlorowa	metoda nitrozoligninowa	metoda chlorowa
1	+ 4	119,5	85,2	65,7	42,6
2	+ 1	71,7	38,3	43,0	21,3
3	+ 5	66,9	51,1	19,1	8,5
4	+ 7	76,5	68,2	28,7	19,1
5	+ 10	109,0	34,0	30,0	0,0
6	+ 14	120,0	64,0	54,0	21,0
7	+ 14	96,0	64,0	43,0	26,0

LITERATURA

[1] Gańczarczyk J., 1955: *Gaz, Woda i Techn. Sanit.*, 29: 117.
[2] Gańczarczyk J., 1955: Oznaczania kwasów ligninosulfonowych za pomocą wody chlorowej. Praca kandydacka. Gliwice.
[3] Joszt A., 1954: *Acta Microbiol. Polon.*, 2: 332.

A. Joszt and *J. Gańczarczyk*

DECOMPOSITION OF LIGNOSULFONIC ACIDS IN AEROBIC CONDITIONS OF A RIVER

Summary

The process of biological decomposition of lignosulfonic acids in aerobic conditions of a river, polluted with waste waters from a sulfite pulp mill, was investigated. The investiga-

tions were carried by two methods of the determination of lignosulfonic acids in the water, based on the colour effects observed at nitrosation or chlorination of these substances.

It was showed that the rate of the decomposition is higher than that of lowering BOD of sewage under the same circumstances. Besides, there was observed during this process the increase of the divergence between the results obtained with nitrosolignin method and with the chlorine one.

A. Joszt, J. Gańczarczyk i *B. Taniewska*

ODBUDOWA KWASÓW LIGNINOSULFONOWYCH METODĄ OSADU CZYNNEGO

DONIESIENIE TYMCZASOWE

Z Zakładu Badań Wodociągowych i Kanalizacyjnych Politechniki Śląskiej w Gliwicach

W zbiorniku napowietrzanym, przy ciągłym przepływie roztworów, prowadzono laboratoryjne badania nad odbudową kwasów ligninosulfonowych metodą osadu czynnego, przy czym osad ten wyhodowano ze ścieków miejskich. Doświadczenia prowadzono roztworami kwasów ligninosulfonowych o stężeniu 100 - 1000 mg/l, zasilanymi pożywkami mineralnymi [$(NH_4)_2SO_4$ i Na_2HPO_4] lub ściekami miejskimi. Do kontroli analitycznej tego procesu stosowano metody oznaczania kwasów ligninosulfonowych w wodzie: nitrozoligninową i chlorową (Gańczarczyk 1955).

Podczas badań stwierdzono, że w urządzeniu doświadczalnym zachodzi odbudowa kwasów ligninosulfonowych z szybkościami reakcji mniejszymi niż przy odbudowie tych substancji w rzece A (k=1.4 - 1.6) (Joszt i Gańczarczyk 1956).

Uzyskane stałe szybkości reakcji tej odbudowy (uważanej za reakcję jednoczasteczkową) wynoszą maksymalnie (przy metodzie osadu czynnego pracującej z dużymi nadmiarami pożywek mineralnych):

dla metody nitrozoligninowej	k = 0.45
dla metody chlorowej	k = 0,65

(k liczono dla 20° i przy dobowym określeniu czasu).

To zjawisko słabszej odbudowy kwasów ligninosulfonowych osadem czynnym niż w aerobowych warunkach rzeki — odbiornika ścieków, tłumaczyć można nieodpowiednimi widocznie dla tego procesu właściwościami użytego osadu czynnego.

Stwierdzono tu także opisane w poprzednim komunikacie równoległe z procesem odbudowy narastanie rozbieżności wyników obu metod oznaczania kwasów ligninosulfonowych.

Poza tym okazało się, przy prowadzeniu odbudowy metodą osadu czynnego wyhodowanego osobno i zasilanego wyłącznie pożywkami mineralnymi, że stosunkowo szybko (w ciągu kilku dni) wygasa jego zdolność odbudowy kwasów ligninosulfonowych, mimo wciąż wzrastającej ilości osadu. Zjawisko to nie zachodzi natomiast przy stałym dodawaniu ścieków miejskich do urządzenia doświadczalnego.

Okazało się również, że nie wszystkie kwasy ligninosulfonowe ulegają odbudowie biologicznej z jednakową szybkością. Stwierdzono to przez stopniowe prowadzenie tego procesu na tym samym roztworze w analogicznych warunkach. Na przykład podczas pierwszego przepływu przez zbiornik napowietrzany stałe szybkości odbudowy wynosiły:

dla metody nitrozoligninowej	k = 0.19
dla metody chlorowej	k = 0,28

Dla następnych przepływów wielkości te nie przekraczały:

dla metody nitrozoligninowej	k = 0.05
dla metody chlorowej	k = 0.16

Zjawiska tego dotychczas nie zauważono przy pomiarach prowadzonych na rzece A (poprzedni komunikat).

Badania powyższe są w toku. Całokształt niniejszej pracy będzie tematem osobnej publikacji.

LITERATURA

[1] Gańczarczyk J., 1955: Oznaczanie kwasów ligninosulfonowych za pomocą wody chlorowej. Praca kandydacka. Gliwice.

[2] Joszt A. i J. Gańczarczyk., 1955: Odbudowa kwasów ligninosulfonowych w tlenowych warunkach rzeki. *Acta Microbiol. Polon.*, 5 : 211.

A. Joszt, J. Gańczarczyk and *B. Taniewska*

DECOMPOSITION OF LIGNOSULFONIC ACIDS BY MEANS OF ACTIVATED SLUDGE

Summary

The subject of the research was the decomposition of lignosulfonic acids by means of activated sludge, obtained from sewages. The determination of lignosulfonic acids in the water was conducted by two analytical methods: nitrosolignin method and chlorine one. It was stated that the rate of the decomposition is lower, than that of analogical process in the river „A", polluted with waste waters from a sulfite pulp mill (see former communication). Moreover it was showed that, when only mineral nutrient solutions are applied, the decomposition of these substances is much slowed. It was also observed that the dynamics of the decomposition of individual fractions of lignosulfonic acids are different.

K. Kluczycki

ZNACZENIE DOBORU BIOCENOZ SWOISTYCH DO OCZYSZCZANIA ŚCIEKÓW PRZEMYSŁOWYCH

ЗНАЧЕНИЕ ВЫБОРА СПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОЦЕНОЗОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

Z Katedry Technologii Ścieków i Wody Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Zagadnienie tzw. biologicznego oczyszczania ścieków przemysłowych nastręcza do dziś jeszcze bardzo duże trudności i wymaga wielu jeszcze opracowań praktycznych.

Autor w swej pracy oparł się na nowej koncepcji użycia do procesu oczyszczania ścieków przemysłowych swoistych biocenoz z nich wyosobnionych i przystosowanych do poszczególnych rodzajów ścieków. Biocenozy takie są nie tylko najbardziej i najtrwalej przystosowane do danych, na ogół niekorzystnych dla nich warunków bytowania w ściekach przemysłowych, lecz wskutek użycia całej biocenozy środowiska istnieje możliwość przesuwania się ruchomego stanu równowagi w biocenozie na korzyść jednej czy drugiej grupy drobnoustrojów, przystosowanych do zmiennych warunków składu i charakteru ścieku.

Biocenozy te użyte zostały do tlenowych procesów, stosowanych częściowo w dotychczasowych typach urządzeń oczyszczających.

Zastosowywane np. w takich warunkach czyste kultury poszczególnych drobnoustrojów, choć dawały czasem duże efekty oczyszczania, ulegały zbyt łatwo degeneracji itp.

Powyższe założenia zostały opracowane przez autora dotychczas na kilku typach ścieków przemysłowych, a to na ściekach pocelulozowych siarczynowych i siarczanowych, fenolowych, koksochemicznych i ściekach garbarskich. W wymienionych wypadkach uzyskano pełne potwierdzenie założeń autora, uzyskując bardzo duże efekty oczyszczania, przekraczające 80 - 90% (do 96%) spadku utlenialności.

SEKCJA — СЕКЦИЯ — SECTION

III

MIKROBIOLOGIA PRZEMYSŁOWA I ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

ТЕХНИЧЕСКАЯ И ПИЩЕВАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 217—224

I. Januszewicz

BIOSYNTEZA DEKSTRANU PRZEZ RÓŻNE SZCZEPY *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*

Z Zakładu Technologii Fermentacji Przemysłowych Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie

Produkcja w skali półtechnicznej dekstranu surowego, służącego dla przemysłu farmaceutycznego jako surowiec do wyrobu dekstranu-leku, została opracowana przez Główny Instytut Przemysłu Rolnego i Spożywczego (Januszewicz i Wojcieszak 1954). Do biosyntezy dekstranu zastosowano szczep *Leuconostoc mesenteroides*, wyosobniony ze zgęstniałej lemoniady i oznaczony jako szczep *L.*

Na podstawie prac doświadczalnych, zarówno w skali laboratoryjnej jak i półtechnicznej, ustalono, że przy stosowanym sposobie prowadzenia fermentacji najkorzystniejsze z punktu widzenia opłacalności procesu jest zakończenie biosyntezy po sześciu dobach.

Celem niniejszej pracy było skrócenie czasu fermentacji.

Pracę prowadzono w dwu kierunkach:

1) znalezienia nowych odpowiedniejszych warunków fermentacji szczepu *L. mesenteroides L.* używanego do produkcji dekstranu na skalę półtechniczną,

2) wyodrębnienia nowego, bardziej aktywnego szczepu oraz dobranie dla niego optymalnych warunków biosyntezy.

METODY BADANIA

1. Fermentację prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 500 ml. Do każdej kolby wlewano 200 ml pożywki, zawierającej 10% sacharozy i odpowiednie sole mineralne. Pożywkę sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 0,5 atm. Autolizat drożdżowy, namok kukurydziany albo wyciąg z kiełków słodowych dodawano sterylnie po ochłodzeniu pożywki.

Autolizat sporządzano według Omeljanskiego (Omeljanski 1940) i sterylizowano go przez sączenie przez filtr Seitza. Namok kukurydziany otrzymano z Centralnego Laboratorium PGR.

Wyciąg z kiełków słodowych sporządzano w następujący sposób: 100 g kiełków słodowych zalewano 900 ml wody wodociągowej i pozostawiano na noc w chłodnym miejscu. Na drugi dzień gotowano w aparacie Kocha przez 0,5 godzin. Po przesączeniu przez bibułę sterylizowano wyciąg w autoklawie przez 20 minut pod ciśnieniem 0,5 atm.

Do szczepienia 200 ml pożywki używano 10 ml 22-godzinnej szczepionki, przygotowanej na podłożu, różniącym się od podłoża stosowanego do fermentacji dwukrotnie większą zawartością autolizatu, namoku kukurydzianego lub wyciągu z kiełków.

2. Oznaczanie wydajności dekstranu surowego. Do kolby Erlenmayera, w której prowadzono fermentację, wlewano około 200 ml 96-procentowego alkoholu etylowego i silnie wstrząsano. Dekstran wytrącał się w postaci gumowanej masy i osiadał na dnie. Po 24 godzinach zlewano alkohol i nalewano znowu około 200 ml alkoholu. Po 24 godzinach zlewano alkohol, kolby wstawiano do suszarki próżniowej i suszono w temperaturze 50° do stałego ciężaru. Z otrzymanej suchej substancji dekstranu obliczano wydajność w przeliczeniu na ilość wprowadzonej sacharozy.

3. Analizy podłoża fermentacyjnego. *pH* podłoża oznaczano potencjometrycznie. Substancje redukujące w przeliczeniu na fruktozę i sacharozę po inwersji oznaczano metodą Luffa-Schoorla. Kwas mlekowy oznaczano kolorymetrycznie z weratrolem w obecności stężonego kwasu siarkowego. Obecność mannitolu stwierdzano przeważnie próbą jakościową. Ze względu na tworzenie się bardzo małych ilości mannitolu metodę nadjodanową do jego oznaczania stosowano rzadko. Kwasy lotne oznaczano przez oddestylowanie z parą wodną i następne miareczkowanie 1/10 N NaOH wobec fenolftaleiny. Wynik przeliczano na kwas octowy. Kwasowość ogólną oznaczano wprost z rozcieńczonej próbki przez miareczkowanie 1/10 N NaOH wobec fenolftaleiny. Wynik przeliczano na kwas mlekowy.

4. Analizy fizykochemiczne naturalnego dekstranu wykonano według techniki podanej przez Januszewicz (1955).

WYNIKI

Próby zmiany warunków fermentacji, w celu skrócenia okresu biosyntezy dla szczepu *L*, nie dały pożądanych rezultatów. Badano wpływ nawietrzenia, mieszania i regulacji *pH* podłoża w czasie fermentacji, zmiany składu pożywki mineralnej, wpływ mikroelementów (Mo^{6+}, Mn^{2+} Al^{3+}, Fe^{3+}, Sb^{3+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Sn^{2+}, Pb^{2+}, B^{3+}, Cu^{2+}) oraz substancji wzrostowych i witamin (wyciągi z kiełków słodowych, z pomidorów, z buraków cukrowych, autolizat drożdżowy oraz czyste preparaty: kwasu p-aminobenzoesowego, ryboflawiny, amidu kwasu nikotynowego, kwasu foliowego, tiaminy, biotyny, pirydoksyny, soli wapniowej kwasu pantotenowego).

Poszukiwanie nowych aktywnych szczepów rozpoczęto w 1954 r. Jako źródło wyosobniania nowych kultur służyły: soki dyfuzyjne, ześlizowaciałe buraki cukrowe i zlepki tzw. żabiego skrzeku z różnych cukrowni, zepsute, wykazujące gęstnienie lemoniady i wina, soki drzew na wiosnę oraz owoce.

Wszystkie kultury, wyosobnione z materiału pochodzącego z cukrowni, wytwarzały dekstran nierozpuszczalny w wodzie.

Z licznych próbek, pochodzących z lasów z okolicy Warszawy, pobranych na wiosnę 1954 i 1955 roku (kawałki kory obok miejsc zranionych, kawałki gałązek) nie udało się wyosobnić bakterii tworzących dekstran, natomiast z drzew owocowych wyosobniono kilka kultur. Każdą czystą kulturę odrębnie wyizolowana nazwano szczepem.

Na podstawie wstępnych doświadczeń z 25 wyosobnionych szczepów wybrano 10 do dalszych badań. Przy wyborze szczepów za podstawę brano własności dekstranu, który winien odpowiadać pod względem chemicznym wymaganiom stawianym przez przemysł farmaceutyczny.

10 badanych szczepów zaliczono według klucza Bergeya (Breed, Murray, Hitchens 1948) do gatunku *Leuconostoc mesenteroides*.

W dalszym ciągu pracy prowadzono doświadczenia, zmierzające do ustalenia optymalnych warunków biosyntezy dekstranu. Jako kryterium przy doborze optymalnego podłoża służyła wydajność surowego (naturalnego) dekstranu w stosunku do ilości wprowadzonej sacharozy *

* Ze 100 g sacharozy otrzymuje się teoretycznie 47,36 g dekstranu i 52,64 g fruktozy.

Na podstawie wielu doświadczeń stwierdzono, że najkorzystniejszy skład zasadniczej pożywki mineralnej dla 9 spośród badanych szczepów jest następujący:

KH_2PO_4	0,1%
$NaNH_4HPO_4$	0,3%
KCl	0,01%
$MgSO_4$	0,01%
$MnCl_2$	0,001%

Każdy szczep wykazywał jednak inne wymagania co do stężenia jonów wodorowych oraz ilości wprowadzonego do podłoża autolizatu, wyciągu z kiełków słodowych lub namoku kukurydzianego. Chodzi tu prawdopodobnie o jakość i ilość substancji wzrostowych wprowadzanych do podłoża.

W tabeli I podano optymalny zakres *pH* podłoża i optymalną dawkę autolizatu dla biosyntezy dekstranu u różnych szczepów *L. mesenteroides* po 6 dobach fermentacji.

Tabela I

Optymalne *pH* i optymalna dawka autolizatu dla syntezy dekstranu przez różne szczepy *L. mesenteroides*

pH and amount of added autolysate optimal for dextran synthesis by various *L. mesenteroides* strains

Nazwa szczepu Denomination of a strain	Optymalny zakres *pH* Optimal *pH*	Optymalna dawka autolizatu w % obj. Optimal dosis of yeast autolysate	Wydajność dekstranu w przeliczeniu na sacharozę w % Yield of dextran (per cent of saccharose consumed)
W_1	7,2 - 7,5	0,40	27,0
P	7,0 - 7,3	0,25	33,5
G	6,5 - 7,0	0,25	33,5
J	6,5 - 7,0	0,25	36,0
S	6,0 - 7,0	0,50	37,5
Pm	6,0 - 7,5	0,15	48,0
L_1	7,0 - 8,0	0,20	40,0
L_2	7,0 - 8,0	0,20	39,0
L_3	—	0,20	40,0
L_4	—	0,40	38,0
L prod.	6,0 - 6,7	0,03	45,0

Wydajność dekstranu pozornie większa od wydajności teoretycznej (szczep *Pm*) powodowana jest zanieczyszczeniami dekstranu surowego przez cukry i sole.

Szczep W_1 wyosobniono z gałązki wiśni, *P* z owocu poziomki, *G* z gruszki, *J* z jabłka, *S* ze śliwki, *Pm* z gałązki porzeczki, wszystkie szczepy oznaczone literą *L* wyosobniono z lemoniady. Ostatni szczep, *L* produkcyjny, jest szczepem używanym do produkcji dekstranu w skali półtechnicznej od 1952 roku.

Na ogół przy przekroczeniu optymalnej dawki autolizatu wydajność dekstranu znacznie spada. Wyjątek pod tym względem stanowią

szczepy *S*, L_3 i L_4, które dają dobre wydajności nawet przy dawce autolizatu wynoszącej 1,6%.

Jeszcze większe różnice występują pomiędzy poszczególnymi szczepami jeśli porównamy zakres *pH*, przy którym obserwuje się rozwój drobnoustrojów (zmętnienie lub gęstnienie pożywki z powodu tworzącego się dekstranu).

Tabela II

Optymalny zakres *pH* dla wzrostu różnych szczepów *L. mesenteroides*
Optimal *pH* range of medium for growth of various *L. mesenteroides* strains

Nazwa szczepu Denomination of a strain	Zakres *pH* Optimal *pH*	Nazwa szczepu Denomination of a strain	Zakres *pH* Optimal *pH*
W_1	5,0 - 8,5		
P	3,0 - 7,75	L_1	5,0 - 10,0
G	5,0 - 8,0	L_2	5,0 - 10,0
J	3,0 - 9,0	L_3	3,0 - 8,0
S	4,0 - 8,5	L_4	3,0 - 7,75
Pm	3,5 - 9,5	*L* (prod.)	4,5 - 7,7

Ze względu na dobre wydajności dekstranu (tabela I) do dalszych badań wzięto szczepy: *J*, *S*, *Pm*, L_1, L_2, L_3 i L_4. Oznaczając wydajności w odstępach jednodobowych uzyskano krzywe charakteryzujące poszczególne szczepy (rysunek 1).

Na wykresie podano również krzywą wzrostu wydajności szczepu używanego do produkcji dekstranu w skali półtechnicznej. Jak widać z wykresu, najlepsze rezultaty uzyskano ze szczepem *Pm*. Przy użyciu tego szczepu można skrócić czas fermentacji do 3 dni, ponieważ wydajność w późniejszym okresie wzrasta już bardzo powoli (od trzeciej do szóstej doby tylko o 5%).

Wszystkie 4 nowe szczepy *L*, wyosobnione z lemoniady, już po trzech dobach fermentacji osiągają wydajność 35 - 38%, jednak dalszy wzrost wydajności jest bardzo niewielki. Pozostałe szczepy (*S* i *J*), jeśli za miernik przyjąć długość okresu fermentacji, są gorsze od szczepu produkcyjnego *L*. Co prawda ze szczepem *S* udało się osiągnąć dobre rezultaty (około 35% wydajności po czterech dobach fermentacji) na zmodyfikowanym podłożu z dużą ilością wody drożdżowej i peptonu, ale uzyskany dekstran zawierał czterokrotnie więcej azotu niż dopuszczają normy. Poza tym szczep ten wytwarzał, w porównaniu z innymi, duże ilości kwasu mlekowego (około 7% w stosunku do ilości sacharozy).

Dalsze badania nad szczepem *Pm* wykazały, że w odróżnieniu od innych szczepów wytwarza on dużo dekstranu przy temperaturze fermentacji od 15 do 30°.

Jak widać z tabeli III, optymalna temperatura fermentacji leży w granicach od 17 do 23°.

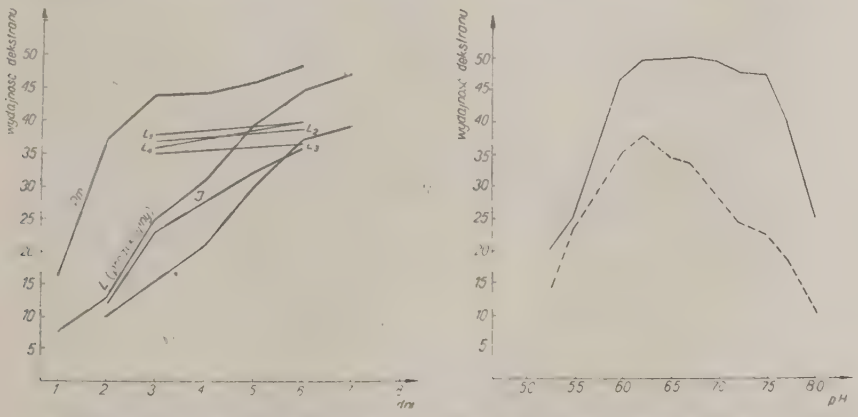
Wstępne obserwacje nad wpływem temperatury na wydajność dekstranu wykazały, że inne szczepy są o wiele wrażliwsze na temperaturę niższą od 20° i wyższą niż 22°.

Tabela III

Wpływ temperatury na wydajność dekstranu
The effect of temperature on the output of dextran

Temperatura fermentacji w °C Temperature of fermentation	Wydajność dekstranu w stosunku do sacharozy w % Yield of dextran (per cent of saccharose consumed)	
	2 doby fermentacji 2 days fermentation	4 doby fermentacji 4 days fermentation
2 - 5	0,9	2,2
12 - 14	23,5	29,0
15 - 16	31,9	43,3
17 - 18	39,7	41,4
18 - 21	44,5	47,6
18 - 23	38,0	48,0
25 - 25,5	—	40,5
26 - 27	32,8	39,2
29 - 29,5	29,5	38,1
32 - 32,5	8,2	26,8
34 - 36	7,6	14,7
37 - 39	ślady	ślady

Wpływ *pH* podłoża na wydajność dekstranu u szczepu *Pm* ilustruje rysunek 2.



Rys. 1. Zależność wydajności dekstranu od długości okresu fermentacji przy użyciu różnych szczepów *L. mesenteroides*

Rys. 2. Wpływ *pH* podłoża na wydajność dekstranu obliczoną w stosunku do ilości sacharozy, (Szczep *Pm*). ———— po 4-dniowej fermentacji, - - - - - - - - - po 2-dniowej fermentacji

Fig. 1. The effect of duration of fermentation period on the output of dextran in cultures of various strains

Fig. 2. The influence of *pH* of medium on the output of dextran ———— after four days of fermentation, - - - - - - - - after two days of fermentation

Jak widać z rysunku, optymalne *pH* leży w granicach 6,0 - 7,5. Obniżenie *pH* poniżej 6,0 powoduje raptowny spadek wydajności, natomiast zmiana *pH* od 7,0 do 7,75 opóźnia tylko fermentację o mniej więcej dwie

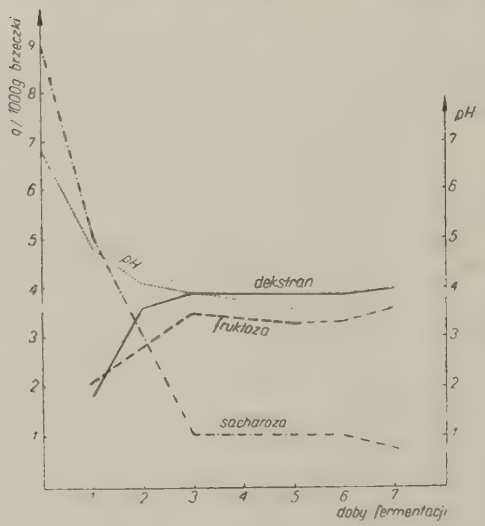
Tabela IV

Wydajność dekstranu w zależności od stężenia sacharozy (w stosunku do sacharozy w %)

Effect of saccharose concentration on the yield of dextran (per cent of saccharose consumed)

Stężenie sacharozy Saccharose concentration	10%	15%	20%	25%	30%	35%
po 2 dniach after 2 days	35,0	30,0	14,8	15,9	15,2	19,2
po 4 dniach after 4 days	49,0	34,5	30,7	28,3	29,7	30,8

doby. Pomiar *pH* w czasie fermentacji wskazuje na to, że najmniej kwasów tworzy się przy optymalnym *pH* dla biosyntezy dekstranu. (Oczywiście przy *pH* bardzo niskim i bardzo wysokim kwasów tworzy się mało, ale związane to jest ze słabym rozwojem drobnoustrojów).



Rys. 3. Fermentacja sacharozy przez *L. mesenteroides*, szczep *Pm*

Fig. 3. The utilisation of saccharose by *Pm* strain

Zwiększenie stężenia sacharozy w podłożu wpływa hamująco na wydajność dekstranu, co widać z tabeli IV. Pozorny wzrost wydajności przy stężeniu sacharozy 35% powodowany jest prawdopodobnie przez pochłanianie przez surowy dekstran nieodfermentowanej sacharozy i fruktozy (dekstran po wysuszeniu posiadał kolor żółtobrązowy wskutek obecności skarmelizowanych cukrów).

Bardzo dobre rezultaty uzyskano dodając do podłoża zamiast autolizatu drożdżowego wyciąg z kiełków słodowych. Namok kukurydziany natomiast nie nadaje się dla szczepu *Pm*. Tabela V ilustruje otrzymane wyniki. Szczepy *S* i W_1 dają lepsze rezultaty przy zastosowaniu namoku kukurydzianego.

W celu lepszego scharakteryzowania szczepu *Pm* oznaczano w czasie fermentacji *pH* oraz zawartość sacharozy, fruktozy i dekstranu.

Tabela V

Wpływ namoku kukurydzianego i wyciągu z kiełków słodowych na wydajność dekstranu (w stosunku do sacharozy w %)

Effect of corn steep liquor and of malt extract on the yield of dextran (per cent of saccharose consumed)

	Namok kukurydziany w % objętości Corn steep liquor (% v.)				Wyciąg z kiełków słodowych w % objętości Malt extract (% v.)			
	0,1	0,2	0,4	0,8	0,5	1	1,5	2
po 2 dniach after 2 days	25,8	22,0	20,5	9,0	23,3	30,3	45,4	45,0
po 4 dniach after 4 days	25,2	23,0	28,8	24,0	30,7	44,5	44,3	45,0

Jak widać na rysunku 3, raptowny spadek ilości sacharozy w brzeczce trwa 3 doby. Do trzeciej doby również wzrasta zawartość dekstranu oraz fruktozy w brzeczce.

STRESZCZENIE

1. Z 25 wyosobnionych szczepów 10 wytwarzało naturalny dekstran odpowiadający wymaganiom stawianym przez przemysł farmaceutyczny.

2. Zasadniczy skład pożywki mineralnej dla wszystkich szczepów (z wyjątkiem jednego) jest jednakowy. Każdy szczep ma indywidualne wymagania co do stężenia jonów wodorowych i substancji wzrostowych, dodawanych w postaci autolizatu drożdżowego, namoku kukurydzianego lub wyciągu z kiełków słodowych.

3. Przy użyciu szczepu *Pm*, wyizolowanego z gałązki porzeczki, można skrócić czas fermentacji do 3 dni (rysunek 1).

4. Szczep *Pm* wykazuje dużą tolerancję na zmiany temperatury i *pH* podłoża, co jest bardzo wygodne przy prowadzeniu fermentacji na skalę przemysłową (tabela III, rysunek 2).

W przeprowadzonych badaniach brały udział: Maria Brzozowska, Maria Blum i Jadwiga Wrońska.

UZUPEŁNIENIE

W celu sprawdzenia przydatności dekstranu surowego, uzyskanego przy pomocy szczepu *Pm*, do przerobu na dekstran — lek, wyprodukowano w skali laboratoryjnej około 6 kg surowego dekstranu w przeliczeniu na suchą substancję i przesłano do Instytutu Farmacji z prośbą o wykonanie hydrolizy i wydanie opinii o otrzymanym z powyższego surowca leku.

Według opinii Instytutu Farmacji surowiec pochodzący ze szczepu *Pm*, przy przerobie wg obowiązujących dotychczas parametrów, daje produkt zbliżony do dotychczasowego. Różnice są jednak większe niż to dopuszczają obecne normy, zwłaszcza dla własności farmakologicznych. Przeprowadzone próby wskazują na możliwość poprawienia własności końcowego produktu. Z przesłanego surowca uzyskano dobrą wydajność dekstranu — leku.

Obecnie posiadane przez Instytut Farmacji wyniki nie pozwalają na wydanie opinii kwalifikującej surowiec do zastosowania w produkcji.

LITERATURA

1. Breed R. S., Murray E. P. B., Hitchens P., 1948: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore.
2. Januszewicz I., Wojcieszak P., 1954 Biosynteza dekstranu przy pomocy szczepu *Leuconostoc mesenteroides L, Prace Głównego Instytutu Przemysłu Rolno-spożywczego*, **4**: 1.
3. Januszewicz I., 1955: Zmiany własności biochemicznych szczepu *Leuconostoc mesenteroides L. Acta Microbiol. Polon.*, **4**: 205.
4. Omeljanski W. L., 1940: Prakticzeskoje rukowodstwo po mikrobiołogii, Moskwa.

I. Januszewicz

BIOSYNTHESIS OF DEXTRAN BY DIFFERENT STRAINS OF *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*

Summary

The aim of this research was shortening of the fermentation period necessary for maximal dextran production.

Strains of *L. mesenteroides* were isolated from sugar-factories, from juices of fruit-trees collected during spring, from fruits and from mucous wines and beverages.

It was showed that growth requirements of tested strains were different.

The optimal *pH* for growth and dextran synthesis varied greatly from strain to strain.

The strain isolated from juice of a branch of red currant was choosed for the farther experiments.

The shortening of the fermentation period to 72 hours was achieved with this strain. The output of the dextran synthesis amounted to 40% of sucrose added. The obtained dextran had the chemical and physical properties demanded by pharmaceutical industry.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 225—230

J. Kovats

DIE BAKTERIOPHAGEN IN DER ACETON-BUTYLALKOHOL-FERMENTATION

Aus dem Institut der Fermentationsindustrie in Warszawa

Obwohl in der Aceton-Butylalkohol-Fermentation die Phagen manchmal grosse Störungen verursachen, mangelt es an eingehenden Publikationen über dieses Thema.

Eine der ersten ist ein amerikanisches Patent von Legg aus dem Jahre 1928. Es werden dort vor allem die zögernd verlaufenden Fermentationen und deren epidemischer Charakter unterstrichen. Es gab Fälle, dass nach Erscheinen einer verzögerten Fermentation in einem Bottig diese Erscheinung sich auf mehrere Bottige, innerhalb von 24 Stunden ausbreitete, die völlig voneinander getrennt arbeiteten.

Eine verzögerte Fermentation ist vor allem durch verlängerten Gipfel der Fermentation und Verzögerung des Fermentationsabschlusses charakterisiert.

Diese Erscheinung verringert in hohem Grade die Menge der Fermentationsprodukte, verschlechtert die Leistungsfähigkeit der Aparatur und führt zu grossen Verlusten.

Die Erscheinungen, mit der Fermentation dieser Art verbunden, werden nach Legg durch Hervortreten von Bekteriophagen verursacht. Durch Angreifen der Butanolbakterien rufen sie deren Degenerierung hervor.

Mc Coy und Mitarbeiter (1944) berichten, dass in einer Butanol-Fabrik innerhalb von einem Jahr vier verschiedene Stämme von Phagen, trotz Verwendung derselben Kultur für die Produktion, erschienen.

Nach den Angaben von Beesch aus dem Jahre 1953, diejenigen Bakteriophagen, die die Aceton-Butanol-Bakterien angreifen, treten in Ackerboden, in den Flüssen, in der Luft und in manchen in der Produktion verwendeten Rohstoffen hervor.

Es gibt Fälle, in denen die Aktivität der Phagen bis zu solchem Grade anwächst, dass die Fermentation überhaupt ausbleibt.

Letztens stellte Kovats fest (1956), dass ein zufriedenstellender Indikator, der die Beobachtung der Phagentätigkeit in der fermentierenden Maische erleichtert, die Methylenblau-Entfärbungsmethode ist.

Während der Lyse verringert sich die Anzahl der Bakterien bis 10% - 20% der ursprünglichen Zahl und die Methylenblaulösung entfärbt sich nicht.

EIGENE BEOBACHTUNGEN

Was das Hervortreten von Bakteriophagen in einer sich in Polen befindenden Butanol-Fabrik, die auf Melasselösungen arbeitet, anbetrifft, hatte diese Erscheinung einen durchaus periodischen Charakter, d. h. dass in manchen Zeitperioden sie eine ziemlich grosse Intensität zeigte, in anderen dagegen, und zwar innerhalb von etlichen Wochen, trat sie nur in geringem Masse hervor.

Sehr interessant ist das mikroskopische Bild einer durch den Phagen angegriffenen Kultur. Anfangs ist keine Anormalität der Fermentation zu beobachten.

In einer späteren Periode beginnt jedoch die Anzahl von Bakterien in der Lösung sich rapide zu verringern.

Die Zellen nehmen oft verkrümmte und stärkere Formen an. Es erscheinen Formen mit Granulationen in der Mitte. In der Maische treten vorzeitig clostridiale Formen hervor. Man könnte hier einen gewissen Selbstverteidigungsprozess gegen die drohende Lyse annehmen. Die Clostridien sind nämlich gegen den lytischen Faktor widerstandsfähig.

In der Endperiode der Lyse beträgt die Anzahl der Bakterien ungefähr 10% - 20% der ursprünglichen Zahl.

Dieser Zustand dauert etliche Stunden an. Die Fermentation erleidet eine Hemmung. Nach einiger Zeit erscheinen in der Lösung wiederum zahlreiche Fäden und Stäbchen, aus den Clostridien entwickeln sich neue Bakterien.

Dieser Prozess hat einen schnellen Verlauf, sodass man annehmen kann, diejenigen Bakterien, die unmittelbar an Lyse leideten, entwickeln sich merklich schneller, als diejenigen, die mit den Phagen nicht in Berührung kamen.

Das zu untersuchende Material wurde der Produktion entnommen. Den Fermentationsbottigen, in denen man die Anwesenheit der Bakteriophagen vermutete, wurden ein paar Liter der Maische entnommen und durch einen Büchner- und anschliessend durch einen Seitz-Filter filtriert. Das so erhaltene Filtrat wurde in einen Eisschrank bei 4° aufbewahrt.

Die Aktivität der Phagen wurde auf folgende Weise untersucht: In ½ Liter-Flaschen wurden 400 ml eines 10 prozentigen sterilisierten Substrats, das aus Gerste-Mehl bestand, vorbereitet.

Die Flaschen wurden mit Wattestopfen verschlossen. Das Substrat wurde mit 10 ml einer Sporen-Kultur, die 45 sekundenlang in kochendem Wasser gehalten, geimpft. Auf diese Weise wurden alle vegetativen Formen vernichtet.

Nach erfolgter Impfung wurde jeder Flasche je ein Tropfen des Phagen-Filtrats zugegeben.

Die Fermentation in den Flaschen wurde bei 37° durchgeführt. Nach beendeter Fermentation (48 Stunden) wurden Aceton und die Azidität bestimmt: 10 ml der Lösung wurden mit 0,1 n NaOH in Gegenwart von Phenolphthalein titriert.

In der ersten Phase der Untersuchungen wurde mit der Feststellung der Zeitdauer und der Temperatur, in welchen sich die Phagen aufbewahren lassen, begonnen.

Diese Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse: Die Filtrate in einer Temperatur von 37° aufbewahrt, wurden innerhalb von 10 Tagen

inaktiv. In der Zimmertemperatur nach ungefähr 17 Tagen und schliesslich bei 4° verloren sie erst nach ungefähr 3 Monaten an Aktivität.

Ein anderes Experiment, das zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Phagen auf die erhöhte Temperatur führen sollte, ergab folgendes:

Die Phagen, die sich in einem Probierglasse mit 10 ml Lösung befinden, ertragen eine Erwärmung bei 60° innerhalb von 5 Minuten, bei 80° eine Erwärmung von zwei Minuten und bei 100° eine Erwärmung von nur einer Minute.

Eine Überschreitung der Erwärmungsdauer in jeder der angegeben Temperaturen hat eine Inaktivierung der Phagen zur Folge.

Die weiteren Untersuchungen hatten das Ziel zu bestimmen, in welchen Verdünnungen die Phagen am meisten aktiv sind.

Es wurden zweckmässig entsprechend verdünnte Lösungen der Phagen vorbereitet und damit die Substrate verseucht. Das Experiment ergab, dass die Aktivität der Phagen bis zu einem gewissen Grade mit dem Verdünnungsgrad ansteigt.

Die höchste Aktivität wurde bei einem Verdünnungsgrad von 10^{-10} beobachtet. Die Menge des produzierten Acetons betrug kaum 1,25 g pro Liter des Substrats, gegen 5,5 g in den Kontrollkolben. Bei einem Verdünnungsgrad von 10^{-14} dagegen lassen sich keine Wirkungserscheinungen der Phagen beobachten.

Eines von den noch zu lösenden Problemen war, ob die Empfindlichkeit der Kulturen auf Verseuchung mit Phagen in verschiedenen Fermentationsperioden gleich ist oder nicht.

Es hing mit dem Entwicklungs-Zyklus zusammen, dem die Butanolbakterien, während der Fermentation unterworfen sind. In diesem Zyklus lassen sich 5 Bakterientwicklungsperioden unterscheiden.

Erste und zweite Periode (bis 12 Stunden der Fermentation). Die Bakterien nehmen die Fadenformen und die Fadenzerfallsformen an. Es erscheinen Stäbchen von verschiedener Länge.

Dritte Periode (bis 26 Stunden der Fermentation). Es ist die Periode der höchsten Aktivität der Kultur.

Die Anzahl der Bakterien in der Lösung erreicht ihren Gipfelpunkt, Stäbchen gleich in Stärke und Länge, oft je zwei miteinander verbunden.

Vierte Periode (bis 35 Stunden der Fermentation) ist durch Erscheinen der clostridialen Formen neben den stäbchenartigen Formen charakterisiert.

Fünfte Periode (bis zum Ende der Fermentation). In der Lösung erscheinen degenerierte Formen und Sporen. Bakterien erleiden Autolyse.

Aus dem Obigen lässt sich vermuten, dass die Empfindlichkeit der Kulturen auf Phagenverseuchung in hohem Grade von der Entwicklungsperiode, in welcher sich die Kultur im Momente der Verseuchung befindet, abhängig ist.

Das Experiment ergab folgendes (siehe Zeichn. 1):

Die Empfindlichkeit einer fermentierenden Kultur auf Phagenverseuchung ist sehr verschieden. Sie ist von der Entwicklungsperiode abhängig, in welcher sich die Kultur im Moment der Verseuchung befindet.

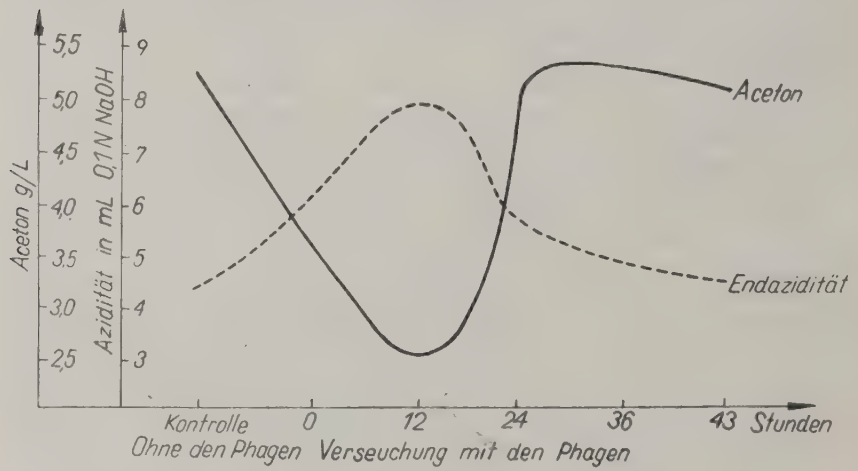
Im Falle wenn die Verseuchung in einer frühen Entwicklungsperiode zwischen 0 und 18 Stunden der Fermentation erfolgt, sind die Fermentationsstörungen am grössten.

Die Verseuchung einer Kultur mit Phagen nach der 24 Fermentationsstunde, d. h. im Moment des Inerscheinungtretens der Clostridien, ist für den Fermentationsverlauf völlig unschädlich obwohl eine erhöhte Azidität der Lösung darauf deutet, dass gewisse Störungen in der Bakterientätigkeit erfolgen mussten.

Diese Störungen sind jedoch unbedeutend und haben auf den Endgehalt des Acetons keinen Einfluss.

Dasselbe lässt sich über Kulturen sagen, welche mit Phagen nach 36 bzw. 46 Fermentationsstunden verseucht wurden.

Die oben angegebenen Untersuchungen hatten den Zweck, die Feststellung, in welcher Weise die Bakterien auf Phagenverseuchung in verschiedenen Fermentationsbedingungen reagieren.



Zeichn. 1. Die Fermentationsverlauf in Abhängigkeit von dem Alter der Kultur in welchem sie mit den Phagen verseucht wurde

Rys. 1. Zależność przebiegu fermentacji od długotrwałości okresu inkubacji, po którym zakażano zacier fagiem

Zu den Untersuchungen wurde stets dieselbe Kultur „R" benutzt, welche bis dahin niemals mit den Phagen in Berührung kam.

In den weiteren Experimenten sollte festgestellt werden, auf welche Weise diejenigen Kulturen, welche durch Lyse angegriffen wurden, auf eine wiederholte Verseuchung mit den Phagen reagieren.

Für diesen Zweck benutzte man Sporen aus der Fermentation, welche in ihren verschiedenen Entwicklungsperioden mit Phagen verseucht wurden. (Die Sporen entstammen der Kultur, die mit dem Phagen am Anfang und nach 12, 24, 36 und 43 Stunden der Fermentation verseucht wurden).

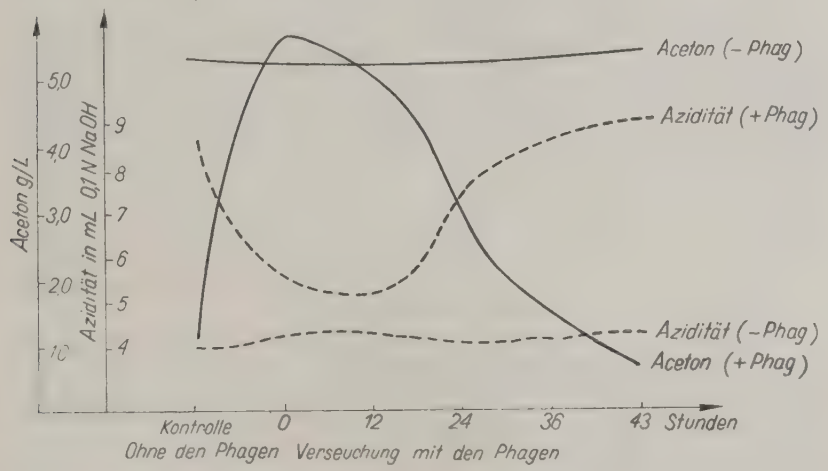
Die Experimente, die durch Zeichn. 2 veranschaulicht sind, ergaben folgendes:

Die Widerstandsfähigkeit einer Kultur gegen Phagenverseuchung ist sehr verschieden und hängt vor allem davon ab, in welcher Entwicklungsperiode sie vorher mit den Phagen das erste Mal in Berührung kam.

Im Falle der Berührung in einer frühen Entwicklungsperiode (in den ersten Stunden der Fermentation) sind die Sporen solcher Kulturen gegen Phagenverseuchung völlig widerstandsfähig.

Im Falle der Verseuchung in den späteren Fermentationsperioden (12 - 36 Stunden) sind die Sporen gegen die Phagen nur teilweise widerstandsfähig.

Die Berührung der Bakterien mit den Phagen in der Endperiode der Fermentation (nach 40 Stunden) hat dagegen keinen Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit der Kultur.



Zeichn. 2. Die Fermentationsverlauf auf den Loesungen die mit einer Kultur geimpft wurden, welche in verschiedenen Fermentationsperioden mit den Phagen verseucht wurde

Rys. 2. Zależność przebiegu fermentacji od wieku w jakim zakażono fagiem hodowlę, używaną do szczepienia zacieru

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Kultur, mit den Phagen verseucht, desto mehr widerstandsfähig gegen sie ist, in je früherer Entwicklungsperiode sie angegriffen wurde.

Daraus lässt sich die praktische Folge ziehen: Will man eine Kultur gegen einen Phagen völlig immunisieren (es betrifft die Sporenbakterien), muss sie in den ersten Stunden der Fermentation, am besten gleichzeitig mit Einführung der Sporen mit den Phagen verseucht werden.

In einer weiteren Untersuchungsfolge wurde beschlossen zu überprüfen, ob die gegen den gegebenen Phagen immunisierten Bakterien diese Widerstandsfähigkeit in den folgenden Aussaaten beibehalten, mit einem Worte, ob die Widerstandsfähigkeit erblich und fortdauernd ist.

Für diesen Zweck wurde die Kultur, die schon einmal in der Anfangsphase der Fermentation mit den Phagen verseucht wurde, hintereinander auf Mehllösungen ausgesät.

In jedem Falle wurde die Fermentation bis zum Ende geführt, d. h. bis zur Sporenbildung.

Die Sporen wurden 7 Tage lang in Zimmertemperatur aufbewahrt und dann wiederum ausgesät.

Auf diese Weise wurden 7 Fermentationen durchgeführt. Die so erhaltenen Sporen wurden gleichzeitig auf ein 10%-iges Mehlsubstrat mit Zugabe von Phagen, ausgesät.

Das Untersuchungsergebnis war, dass alle zur Verwendung gekommenen Kulturen gegen eine wiederholte Phagenverseuchung widerstandsfähig waren. Es zeugt davon, dass die Widerstandsfähigkeit eine permanente und erbliche Eigenschaft ist.

Die Befürchtungen, dass die eventuelle Immunisation der Kultur gegen den Phagen, verbunden mit der Erniedrigung der Fermentationsfähigkeit sein könnte, bestätigen sich nicht.

Im Endresultat, die oben durchgeführten Experimente erlaubten die Bekämpfung der Produktionsschwierigkeiten, die in der Butanol-Fabrik durch Phagen verursacht wurden.

LITERATUR

1. Beesch S. C., 1953: A Microbiological Process Report (Acetone-Butanol Fermentation of Starches). *J. App. Microbiol.*, **1** : 85.
2. Kovats J., 1956: Störungen verursacht durch die Bakteriophagen in der Butanolproduktion. *Przem. Spoż.*, **10** : 17.
3. Legg D. A., 1928: Art of Butyl-Acetonic fermentation U.S.P. 1, 668, 814.
4. Mc Coy E., Mc Daniel, L. E. and Sylvester J. C., 1914: Bacteriophage in a butyl fermentation plant. *J. Bact.*, **47** : 443.

J. Kovats

BAKTERIOFAGI W FERMENTACJI ACETONO-BUTANOLOWEJ

Streszczenie

Autor przeprowadził szereg badań i obserwacji nad przebiegiem fermentacji butanolowych zakażonych fagami.

Ustalono, że fagi można przechowywać około 10 dni w temperaturze 37°, około 17 dni w temperaturze pokojowej i około 3 miesiące w temperaturze 4°.

Fag wytrzymuje (w probówce, 10 ml płynu) 5-minutowe ogrzewanie w temperaturze 60°, 2-minutowe w temperaturze 80° i 1-minutowe w temperaturze 100°.

Zjadliwość faga wzrasta w miarę jego rozcieńczenia. Przy rozcieńczeniu 10^{-10} zjadliwość faga jest największa. Wrażliwość kultury na zakażenie fagiem jest bardzo różna i zależy od wieku kultury.

Bakterie są najbardziej wrażliwe na faga w początkowych okresach fermentacji. W stadium tworzenia się klostridii są już niewrażliwe. Kultury zaatakowane przez fagi uodparniają się na nie w różnym stopniu, w zależności od wieku, w którym kultura została zakażona.

Kultury uodpornione na faga nie tracą na aktywności fermentacyjnej. Odporność ta jest dziedziczna i trwała.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 231—234

E. Kocwa

WPŁYW PENICYLINY NA WYTWARZANIE ACETONU PRZEZ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej IPF w Krakowie

Praca niniejsza jest dalszym ciągiem badań nad wpływem antybiotyków na procesy fermentacyjne. Poprzednio (K o c w a 1955) ustalono działanie penicyliny i aureomycyny na fermentację alkoholową, mlekową i octową, przy czym wykazano, że bakterie mlekowe (*Thermobact. cereale*) są wrażliwe na obecność penicyliny w płynach fermentacyjnych. Niezależnie od tego inni autorzy także stwierdzili brak tolerancji innych bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do penicyliny i innych antybiotyków. Ponieważ bakterie mlekowe są przyczyną wysoce szkodliwych zakażeń fermentacji acetonowo-butanolowej, praca niniejsza miała na celu określenie wpływu penicyliny na drobnoustroje prowadzące ten proces.

METODY BADAŃ

Badania dokonano metodą stosowaną przez nasz przemysł. Wyniki oparto na miareczkowym oznaczaniu zawartości kwasów oraz na analizie przefermentowanych zacierów, wyrażającej ilość powstałego acetonu. Aceton oznaczano metodą Messingera. Penicylinę, w postaci wodnego roztworu soli potasowej o nazwie „Leopenicillin", dawkowano przy pomocy kalibrowanej strzykawki. Najpierw zbadano wpływ kilku dawek tego antybiotyku wprowadzając go równocześnie z zaszczepianiem zacierów głównej fermentacji, po czym wybrano dwie niskie dawki hamujące i obserwowano ich działanie na kolejne stadia rozwojowe bakterii. Próby prowadzono w 400 - 500 ml zacieru jęczmiennego 3 - 9-procentowego w warunkach optymalnych dla fermentacji acetono-butanolowej, w 2 - 3 powtórzeniach. Wyniki zebrano w tabele, gdzie symbolem K oznaczono próby kontrolne. Stosowana mąka zawierała 57,3% cukru.

WYNIKI BADAŃ

We wszystkich doświadczeniach posługiwano się czystą kulturą *5 Ch 4 3* otrzymaną z fabryki, z tym że do badań nad różnymi stadiami rozwojowymi bakterii użyto świeżo rozprowadzonej kultury po 3-miesięcznym przechowywaniu. Próbę wstępną wykonano na 9-procentowym zacierze w ilości 500 ml. Dawki penicyliny na tę objętość podłoża wynosiły: Nr 1 — 5 j., Nr 2 — 50 j., Nr 3 — 500 j., Nr 4 — 5000 j. i Nr 5 — 50 000 j. Od 10 do 36 godziny fermentacji oznaczano kwasowość ogólną w odstępach 2-godzinnych, powtarzając to samo po 62 i 72 godzinach. Po 4 tygodniach obserwacji prób Nr 2 i Nr 3 spostrzeżono w obrazie mikroskopowym liczne żywe bakterie i dlatego jeszcze dodatkowo oznaczono aceton po 6 tygodniach. Tabela I przedstawia ilość wytworzonych kwasów, wyrażoną w ml 0,1 N NaOH, zaś tabela II zawiera wyniki analiz na zawartość acetonu między drugą a trzecią dobą fer-

mentacji. W tabeli III umieszczono odnośne parametry uzyskane po 6 tygodniach.

Tabela I

Wpływ penicyliny na wytwarzanie kwasów przez *Cl. acetobutylicum*
Влияние пенициллина на образование кислот *Cl. acetobutylicum*

Znak próby / Знак пробы	Kwasowość w ml 0,1 N NaOH po godzinach / Кислотность в мл 0,1 N NaOH по истечении часов													
	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
K	7,2	7,5	5,3	4,5	4,2	4,1	4,0	4,0	3,9	3,8	4,2	4,4	4,6	4,7
Nr 1	7,2	7,9	7,5	5,9	5,2	4,9	4,5	4,4	4,3	4,1	4,2	4,2	4,7	4,9
Nr 2	2,2	2,2	2,2	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Nr 3	2,3	2,4	2,4	2,4	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Nr 4	1,9	1,7	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Nr 5	2,0	2,3	2,3	2,3	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9	1,9

Tabela II

Wpływ penicyliny na wytwarzanie kwasów i acetonu po 62 i 72 godzinach fermentacji
Влияние пенициллина на образование кислот и ацетона после 62 и 72 часов ферментации

Znak próby / Знак пробы	Dawka penicyliny w j./ml / Доза пенициллина в ед./мл	Kwasowość ogólna / Общая кислотность		Zawartość acetonu w g/100 ml / Содержание ацетона в г/100 мл	
		po 62 godz. / после 62 ч.	po 72 godz. / после 72 ч.	po 62 godz. / после 62 ч.	po 72 godz. / после 72 ч.
K	0,00	5,2	4,8	0,514	0,484
Nr 1	0,01	5,3	4,9	0,476	0,469
Nr 2	0,10	2,5	2,4	0,015	0,015
Nr 3	1,00	2,4	2,3	ślady	ślady
Nr 4	10,00	1,9	1,8	„	„
Nr 5	100,00	1,9	1,9	„	„

Tabela III

Zawartość acetonu po 6 tygodniach fermentacji w obecności penicyliny
Количество ацетона после 6 недель ферментации в присутствии пенициллина

Znak próby / Знак пробы	Dawka penicyliny w j./ml / Доза пенициллина в ед./мл	Zawartość acetonu w g/100 ml / Количество ацетона в г/100 мл
K	0,00	0,385
Nr 1	0,01	0,370
Nr 2	0,10	0,109
Nr 3	1,00	0,101
Nr 4	10,00	ślady
Nr 5	100,00	„

Jak wynika z tabel, najniższa stosowana dawka penicyliny (0,01 j./ml) w zasadzie nie wpływa na przebieg fermentacji. Produkcja kwasów nawet nieznacznie wzrasta w porównaniu z kontrolą, a zawartość acetonu, wprawdzie nieco niższa po 62 i 72 godzinach, pozwala na podstawie krzywej kwasowości przypuszczać, że we wcześniejszym stadium fermentacji nie było acetonu mniej niż w kontroli. Następna dawka wynosząca 0,1 j./ml wykazuje już zdecydowane zahamowanie wytwarzania kwasów i acetonu przez bakterie, co dotyczy również wszystkich następnych dawek. Wyniki tabeli III świadczą jednak o tym, że dawki penicyliny 0,1 i 1 j. ml działały tylko silnie bakteriostatycznie, lecz nie bakteriobójczo.

Następna próba miała na celu ustalenie wpływu dawek 0,1 i 0,15 j./ml na różne stadia rozwojowe tych drobnoustrojów przez wprowadzenie penicyliny do zacierów w odstępach 6-godzinnych. Mniej więcej w tych okresach następują morfologiczne zmiany w rozwoju bakterii. Przygotowano zatem 16 kolb z identycznym zacierem, tym razem 8-procentowym, których zawartość zaszczepiono równocześnie, do dwóch kolb wprowadzając penicylinę od razu. Resztę nastawów umieszczono w termostacie, skąd po dwie kolby wyjmowano co 6 godzin i dawkowano antybiotykiem. Fermentację prowadzono w 400 ml zacieru stosując penicylinę tej samej produkcji z następnej fiolki. Dla I, II, III stadium dawki wynosiły 0,1 j./ml, dla następnych zaś 0,15 j./ml. Wyniki analiz wykonanych po 48 i 62 godzinach przedstawia tabela IV.

Tabela IV

Wpływ penicyliny na wytwarzanie kwasów i acetonu w zależności od stadium rozwojowego bakterii

Влияние пенициллина на образование кислот и ацетона в зависимости от стадии развития бактерий

Znak próby Знак пробы	Stadium rozwoju Стадия развития	Dawka penicyliny w j./ml Доза пенициллина в ед./мл	Kwasowość w ml 0,1 N NaOH Кислотность в мл 0,1 N NaOH		Aceton w g/100 ml Ацетон в г/100 мл	
			po 48 godz. после 48 ч.	po 62 godz. после 62 ч.	po 48 godz. после 48 ч.	po 62 godz. после 62 ч.
K_I	I—VII	0,00	4,2	3,8	0,570	0,556
K_{II}	I—VII	0,00	4,2	4,1	0,570	0,560
A_I	I	0,10	3,8	4,3	0,328	0,440
A_{II}	I	0,10	4,7	4,7	0,498	0,518
B_I	II	0,10	4,2	4,5	0,570	0,575
B_{II}	II	0,10	4,4	4,5	0,566	0,570
C_I	III	0,10	4,4	4,1	0,546	0,551
C_{II}	III	0,10	4,5	3,8	0,560	0,556
D_I	IV	0,15	4,0	4,6	0,508	0,513
D_{II}	IV	0,15	4,4	4,5	0,522	0,532
E_I	V	0,15	4,1	4,0	0,532	0,498
E_{II}	V	0,15	4,3	4,2	0,570	0,518
F_I	VI	0,15	4,3	4,0	0,570	0,575
F_{II}	VI	0,15	4,5	4,1	0,575	0,570
G_I	VII	0,15	4,4	4,0	0,566	0,546
G_{II}	VII	0,15	4,0	4,0	0,546	0,546

Na podstawie otrzymanych rezultatów można wysnuć następujący wniosek: penicylina w stosowanej dawce wpływa hamująco jedynie na I stadium, nie wpływa zaś na stadia następne. W I stadium rozwojowym, a więc w okresie powstawania nitkowatych form bakteryjnych, drobnoustroje te są najwrażliwsze na działanie penicyliny. Prawdopodobnie, tak jak to stwierdzono u innych bakterii (cytowane według Kuryłowicza 1946), penicylina hamuje podział i rozmnażanie komórek. II stadium zawierające już „nici" rozpadłe na człony nierównomierne co do długości i szerokości, jest niemal zupełnie niewrażliwe na obecność stosowanej dawki penicyliny. W III stadium (największej aktywności kultury) oraz w IV (początek tworzenia się klostridiów) bakterie tylko nieznacznie reagują na penicylinę. Następne stadia nie wykazują zasadniczych zmian wobec nieco wyższej dawki (0,15 j./ml). Równoległe badania mikroskopowe potwierdzają to.

Niezależnie od badań niniejszych przeprowadzono wstępne doświadczenia z chloromycetyną w związku z badaniami Kovatsa (1956) na temat zaburzeń fermentacji acetono-butanolowej, wywołanych bakteriofagiem. Badany szczep *Clostridium* wykazał całkowitą odporność wobec 50 γ/ml i około 50-procentową wrażliwość na dawkę 500 γ/ml. Wrażliwość na tę wysoką dawkę znacznie zmalała, gdy wprowadzono ją w późniejszym stadium fermentacji. Badania te pozostają w toku.

Poczuwam się do miłego obowiązku podziękowania dr J. Kovatsowi za udostępnienie własnej i fabrycznej literatury oraz Koleżankom i Kolegom z odnośnych fabryk, a w szczególności mgr R. Białasowi za zaznajomienie z metodami przemysłowymi.

LITERATURA

1. Kocwa E., 1955: Działanie penicyliny i aureomycyny na *Saccharomyces cerevisiae, Thermobacterium cereale* i *Acetobacter rancens*. *Acta Microbiol. Polon.*, **4**: 11.
2. Kovats J., 1956: Die Bakteriophagen in der Aceton-Butylalkohol-Fermentation. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**:225.
3. Kuryłowicz W., 1946: Penicylina., Książnica-Atlas, Wrocław—Kraków.

E. Коцва

ВЛИЯНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНА НА ОБРАЗОВАНИЕ АЦЕТОНА *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*

Резюме

Исследовано влияние пенициллина на образование ацетона *Clostridium acetobutylicum*. Применялись следующие дозы пенициллина: 0,01 ед., 0,10 ед., 1,0 ед., 10,0 ед., 100,0 ед./мл. Обнаружено, что доза 0,01 ед./мл. не влияет на ход ферментации, однако большие количества пенициллина, добавленные в питательную среду совместно с бактериями, задерживают ход ферментации. Добавление 0,1 ед./мл. в различных стадиях развития бактерий (в 6-часовых промежутках времени) задерживает ход ферментации лишь в первой стадии развития, в последующих же стадиях не проявляет никакого действия. Обнаружено кроме того, что *Cl. acetobutylicum* является устойчивым при воздействии на него 50 γ хлоромицетина в 1 мл.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 235—239

J. Snaglewska

OCZYSZCZANIE WYWARU PO FERMENTACJI ACETONOWO-BUTANOLOWEJ NA DRODZE FERMENTACJI BEZTLENOWEJ

Z Zakładu Utylizacji Wód Ściekowych Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie

Wywar butanolowy, powstający jako produkt odpadkowy po fermentacji acetonowo-butanolowej, jest jednym z bardziej uciążliwych ścieków przemysłowych. Analiza chemiczna tego wywaru wykazała znaczną zawartość suchej pozostałości, wynoszącą przeciętnie od 25 g do 30 g w litrze, dużą zawartość substancji organicznych (15 - 20 g/l), utlenialność przeciętnie około 10 000 mg O_2/l oraz biochemiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT_5) od 12 000 do 18 000 mg O_2/l. Związki organiczne występują tu głównie w roztworze, ilość zawiesin jest stosunkowo niewielka i wynosi przeciętnie 1 g/l wywaru.

Wody ściekowe tak silnie obciążone nie mogą być bezpośrednio spuszczane do odbieralnika bez uprzedniego ich oczyszczenia. Odnośnie oczyszczania wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej w literaturze znaleziono tylko jedną, krótką notatkę (Boruff, 1939) mówiącą, że wywar taki może być unieszkodliwiany na drodze standardowej metody fermentacji beztlenowej, uzupełnionej fermentacją tlenową, może być również zatężany, suszony i stosowany jako domieszka do paszy, albo też spalany i stosowany jako nawóz.

Związki organiczne zawarte w wywarze mogą stanowić doskonałą pożywkę dla mikroorganizmów rozkładających w warunkach beztlenowych substancje organiczne z wytworzeniem mieszaniny gazów, głównie metanu i dwutlenku węgla. Proces ten, określany jako fermentacja beztlenowa (często nazywany fermentacją metanową), nie wymaga stosowania czystych kultur mikroorganizmów, ponieważ odpowiednia mikroflora jest szeroko rozpowszechniona i zawsze występuje w rozkładających się związkach organicznych. Dla zapoczątkowania właściwej fermentacji najkorzystniej jest stosować, jako zaszczepienie, osad z wydzielonych komór fermentacji beztlenowej dobrze pracującej oczyszczalni.

DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Próby laboratoryjne zastosowania fermentacji beztlenowej do oczyszczania wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej miały na celu zbadanie:

1) wpływu temperatury na szybkość przebiegu procesu oczyszczania,
2) stopnia mineralizacji związków organicznych zawartych w wywarze,
3) wpływu ilości zaszczepienia na przebieg fermentacji.

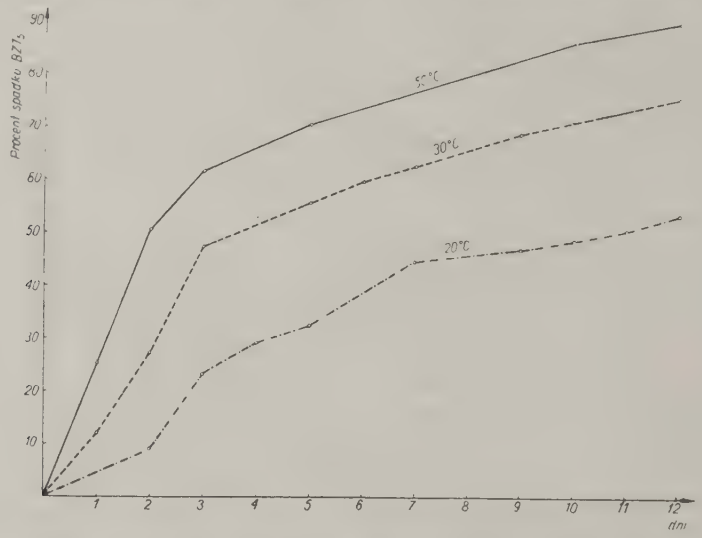
4) wpływu czasu trwania fermentacji na efekt oczyszczania.

Fermentację beztlenową wywaru butanolowego prowadzono w 3-litrowych butlach szklanych, zamkniętych rurkami fermentacyjnymi albo połączonych wężem gumowym z kalibrowanymi butlami szklanymi umożliwiającymi pomiar wydzielanego gazu.

WPŁYW TEMPERATURY I CZASU TRWANIA FERMENTACJI BEZTLENOWEJ NA SPADEK ZANIECZYSZCZENIA

Dla zbadania wpływu temperatury i czasu trwania fermentacji beztlenowej na spadek zanieczyszczenia przeprowadzono doświadczenia w temperaturze 20° (temperatura otoczenia), w temperaturze 30°, optymalnej dla procesów mezofilnych, oraz w temperaturze 50°, optymalnej dla procesów termofilnych.

Doświadczenie przeprowadzono w trzech butlach szklanych, o pojemności 3 l każda, do których dano po 20% zaszczepienia pochodzącego



Rys. 1. Wpływ temperatury fermentacji beztlenowej na spadek zanieczyszczenia
Fig. 1. Effect of temperature of anaerobic fermentation on the decrease in BOD

z wydzielonych komór fermentacji beztlenowej jednej z dobrze pracujących oczyszczalni miejskich. Butle dopełniono wywarem i umieszczono w termostacie w temperaturze 30° i 50°, a jedną butlę pozostawiono w temperaturze pokojowej. W ciągu kolejnych następnych dni badano spadek zanieczyszczenia.

Wyniki otrzymane z przeprowadzonych doświadczeń wykazały (rysunek 1), że proces fermentacji beztlenowej najszybciej przebiegał w temperaturze odpowiadającej procesom termofilnym (50 - 55°), nieco wolniej w temperaturze właściwej procesom mezofilnym (30 - 35°), a znacznie wolniej w temperaturze optymalnej dla organizmów psychrofilnych

(15 - 20°). Na efekt, jaki się uzyskuje w temperaturze 50° w ciągu 10 dni, w temperaturze 30° potrzeba około 12 dni, a w temperaturze 20° — 28 dni. Podniesienie temperatury fermentacji z 20° do 30° daje przeciętnie zwiększenie spadku zanieczyszczeń o 20%, a podniesienie temperatury do 50° zwiększa efekt oczyszczania o dalsze 10 - 20%. Wszystkie procentowe spadki zanieczyszczeń odnoszą się do pięciodniowego biochemicznego zapotrzebowania tlenu.

WPŁYW ILOŚCI ZASZCZEPIENIA I CZASU TRWANIA FERMENTACJI BEZTLENOWEJ NA SPADEK ZANIECZYSZCZENIA

Drugą serię doświadczeń przeprowadzono celem zbadania wpływu ilości zaszczepienia i czasu trwania fermentacji beztlenowej na spadek zanieczyszczenia.

Fermentacje prowadzono systemem dolewowym, dodając codziennie pewną określoną ilość surowego wywaru. Doświadczenia przeprowadzono z zaszczepieniem w ilościach 12, 25 i 50% w stosunku do pojemności butli fermentacyjnej. Czas trwania fermentacji wynosił 5 i 3 dni. Doświadczenie prowadzono w temperaturze 30°.

Do trzech butli szklanych, o pojemności 3 l każda, dano zaszczepienie w ilości 12, 25 i 50%, dodając codziennie po 600 ml surowego wywaru, co równało się 1/5 pojemności butli, czyli okres fermentacji wywaru wynosił 5 dni. Dolewy stosowano codziennie, aż do napełnienia butli. Po napełnieniu butli zlewano codziennie 600 ml przefermentowanego płynu, a na jego miejsce dodawano 600 ml wywaru surowego. Wywar przefermentowany dawano do leja Imhoffa i po godzinie odstania wykonywano analizę chemiczną.

Otrzymane wyniki (przedstawione w skrócie w tabeli I) wskazują na pewne niewielkie zwiększanie się efektu oczyszczania w miarę wzrostu ilości zaszczepienia. Procentowy spadek zanieczyszczenia wyrażony w biochemicznym zapotrzebowaniu tlenu, dla fermentacji 5-dniowej wahał się w granicach od 73 do 86% w zależności od ilości zaszczepienia.

Fermentację beztlenową 3-dniową poprowadzono w podobny sposób jak fermentację 5-dniową, z tą jednak różnicą, że codzienne dolewy wynosiły 1000 ml na dobę, a nie 600 ml, jak w doświadczeniu poprzednim.

Tabela I

Wpływ czasu trwania fermentacji i ilości zaszczepienia na efekt oczyszczania przy fermentacji beztlenowej jednostopniowej

Effect of the duration of a fermentation and of the amount of inoculum on the decrease in BOD. One-step fermentation

Ilość zaszczepienia inoculum	% spadku zanieczyszczenia Purification (per cent)					
	Fermentacja 5-dniowa 5 days fermentation			Fermentacja 3-dniowa 3 days fermentation		
	12%	25%	50%	12%	25%	50%
utlenialność oxygen absorbed from permanganate	56	62	66	54	64	63
BZT_5 BOD	73	81	86	59	76	80
substancja organiczna organic substances	73	77	82	62	70	75

Analizy przefermentowanego wywaru wykazały (tabela I), podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, wpływ zwiększenia ilości osadu na podniesienie spadku zanieczyszczenia. Przy tym wyraźnie dało się zauważyć, że zwiększenie ilości zaszczepienia z 12% do 25% w znaczniejszym stopniu wpływa na zwiększenie efektu oczyszczania. Dalsze zwiększanie ilości zaszczepienia powyżej 25% wpływa już w bardzo niewielkim stopniu na efekt oczyszczania. Spadek zanieczyszczenia przy fermentacji 3-dniowej w biochemicznym zapotrzebowaniu tlenu był nieco niższy niż przy fermentacji 5-dniowej i wahał się w granicach od 59 do 80% w zależności od ilości zaszczepienia.

FERMENTACJA BEZTLENOWA DWUSTOPNIOWA

Obok fermentacji beztlenowej jednostopniowej często dla uzyskania wyższego stopnia oczyszczenia stosuje się fermentację beztlenową dwustopniową, polegającą na prowadzeniu procesu w dwóch połączonych ze sobą zbiornikach. Ścieki przepływają najpierw przez zbiornik pierwszy (I stopień), gdzie następuje częściowe oczyszczanie, a następnie przepływają do zbiornika drugiego (II stopień), w którym zachodzi dalsze oczyszczanie ścieków.

Laboratoryjne próby oczyszczania wywaru na drodze fermentacji beztlenowej dwustopniowej przeprowadzono w dwóch butlach szklanych o pojemności 3 l (I stopień) i 2 l (II stopień). Ilość zaszczepienia wynosiła w obu wypadkach 25%. Pierwszy stopień fermentacji odpowiadał kolejno fermentacji 5-dniowej, 3-dniowej i 2-dniowej. Drugi stopień fermentacji odpowiadał każdorazowo fermentacji 2-dniowej. Dolew w drugim stopniu fermentacji robiono ze zdekantowanego płynu z fermentacji I stopnia. Biorąc pod uwagę pojemność zbiornika pierwszego i drugiego, ogólny czasokres fermentacji wynosił odpowiednio 7, 5 i 4 dni. Wyniki przebiegu fermentacji przedstawiono w tabeli II.

Tabela II

Wpływ czasu trwania fermentacji na efekt oczyszczania przy fermentacji beztlenowej dwustopniowej

Effect of the duration of a fermentation on the decrease in BOD. Two-steps fermentation

	% spadku zanieczyszczenia Purification (per cent)					
	fermentacja 5 + 2 dni fermentation 5 + 2 days		fermentacja 3 + 2 dni fermentation 3 + 2 days		fermentacja 2 + 2 dni fermentation 2 + 2 days	
	I	II	I	II	I	II
utlenialność oxygen absorbed from permanganate	77	78	64	70	41	61
BZT_5 BOD	77	85	75	84	56	71
substancje organiczne organic substances	76	83	69	73	60	70

Fermentacja dwustopniowa 7-dniowa (5 + 2 dni) w pierwszym stopniu oczyszczania dała spadek zanieczyszczenia wynoszący średnio w biochemicznym zapotrzebowaniu tlenu 77%. Drugi stopień zwiększył spadek zanieczyszczenia średnio o dalsze 8% w stosunku do obciążenia początkowego, dając w sumie po 7 dniach fermentacji 85% spadku. Spadki w utlenialnościach (78%) i w zawartości substancji organicznej (83%) są bardzo zbliżone do spadków w BZT_5.

Fermentacja dwustopniowa 5-dniowa (3+2 dni) dała w pierwszym stopniu oczyszczania 75% spadku w biochemicznym zapotrzebowaniu tlenu, w drugim stopniu dalsze 9%, czyli w sumie po 5 dniach fermentacji otrzymano 84% spadku zanieczyszczenia. Wynik ten jest bardzo zbliżony do stopnia oczyszczania uzyskanego po fermentacji 7-dniowej. Zjawisko to można wytłumaczyć w ten sposób, że przy zwiększonym dopływie substancji organicznej (w pewnych granicach) procesy biologiczne zachodzą intensywniej, dzięki czemu oczyszczanie następuje szybciej niż przy pewnym niedoborze substancji organicznej.

Fermentacja dwustopniowa 4-dniowa (2+2 dni) dała w pierwszym stopniu średnio 56% spadku zanieczyszczenia w BZT_5, podczas gdy drugi stopień zwiększył stopień oczyszczania o dalsze 15% w stosunku do obciążenia początkowego a więc znacznie więcej niż w fermentacjach poprzednich 7- i 5-dniowych. Większy dopływ substancji organicznej z I stopnia zwiększył efekt działania stopnia II. W sumie uzyskano 71% spadku zanieczyszczenia po 4 dniach fermentacji.

WNIOSKI

1. Spadek zanieczyszczenia wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej, uzyskiwany na drodze fermentacji beztlenowej, uzależniony jest od temperatury procesu oraz od ilości zaszczepienia użytego do prowadzenia fermentacji.

2. Proces fermentacji beztlenowej najszybciej przebiegał w temp. 50 - 55°, dając najszybszy efekt oczyszczania wywaru.

3. Optymalna ilość zaszczepienia potrzebnego do prowadzenia fermentacji beztlenowej wywaru wynosiła 20 - 25%. Dalsze zwiększanie ilości zaszczepienia podnosi efekt oczyszczania w bardzo niewielkim stopniu.

LITERATURA

1. Boruff C. S., 1939: Waste problems in the fermentation industry., *Ind. Eng. Chem.*, **31**: 1335.

J. Snaglewska

ANAEROBIC TREATMENT OF SLOPS FROM THE ACETONE-BUTANOL FERMENTATION

Summary

The results of the anaerobic treatment of the slops from acetone-butanol fermentation depend on the temperature of the process, on the period of retention and on the amount of digesting sewage sludge used. The best effect, about 80% decrease in 5-day BOD, was obtained during 5-days retention period at 50 - 55°C. The rate of decomposition decreases with decrease of temperature and of inoculum.

Tablica VII

Do pracy: Dłużewski, str. 241

Kolonie olbrzymie drożdży osmofilnych na brzeczce z żelatyną. Inkubacja — 3 miesiące, pow. 2 x

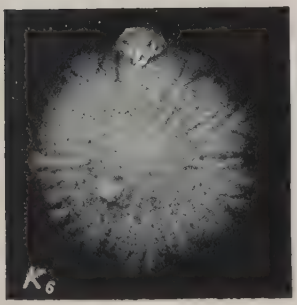
Table VII

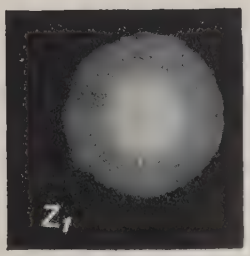
To the paper of Dłużewski, p. 241

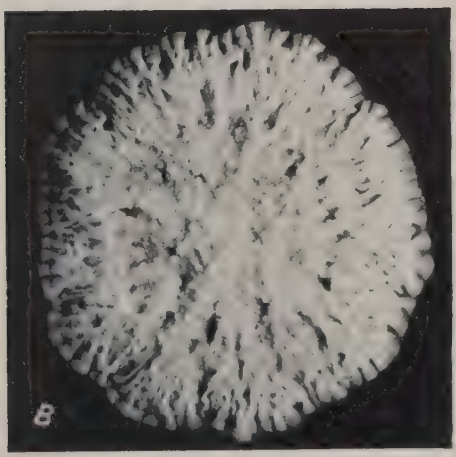
Giant colonies of osmophilic yeasts on malt gelatine after 3 months incubation. 2 x

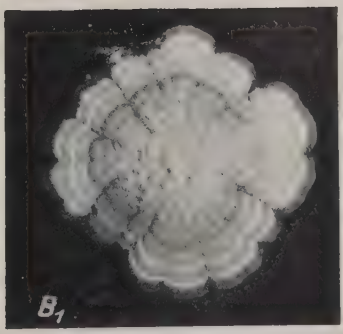
G_1

G_2


K_6


Z_1


B


B_1

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 241—243

M. Dłużewski

CHARAKTERYSTYKA DROŻDŻY WYWOŁUJĄCYCH FERMENTACJĘ SYROPÓW OWOCOWYCH I STĘŻONEGO SOKU GRONOWEGO

Z Katedry Przemysłu Rolno-Spożywczego SGGW w Warszawie

Rozwój drożdży w środowisku o dużym stężeniu cukru, jak miód, konfitury, dżem itp. jest zjawiskiem powszechnie znanym. Wyodrębnione z tych produktów drożdże tzw. osmofilne jedni z autorów uważają za biologicznie odrębną grupę, np. Kudriawcew (1954) zalicza je do jednego gatunku, *Zygosaccharomyces Bailli*; inni twierdzą, że wśród drożdży osmofilnych znajdować się mogą przedstawiciele nie tylko z rodzaju *Zygosaccharomyces*, ale i *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Mycotorula* i *Torula* (Lochhead i Karrell 1936). Prace podjęte w Katedrze Przemysłu Rolno-Spożywczego SGGW mają na celu bliższe poznanie drożdży osmofilnych, występujących u nas głównie w syropach owocowych i będących przyczyną znacznych strat na skutek sfermentowywania tych syropów.

Pierwsze szczepy drożdży wyizolowano metodą płytkową w 1952 roku z różnych odmian sfermentowanych syropów owocowych nadesłanych przez zakłady produkcyjne położone w różnych rejonach Polski. W czasie prowadzenia hodowli drożdży na brzeczce o gęstości 10° Blg stwierdzono, że komórki ich stały się większe, zatraciły dawny kształt kulisty i przeszły w formy wydłużone, występujące niekiedy w postaci rozgałęzień.

Nastawione próby fermentacyjne z drożdżami hodowanymi kilkanaście miesięcy wykazały częściowy zanik ich własności osmofilnych. Powtórną fermentację pożywek zawierających około 70% cukru uzyskano dopiero po stopniowym przyzwyczajaniu drożdży do coraz większych stężeń cukru. W czasie tych obserwacji stwierdzono, że osmofilność można zachować u drożdży hodując je na brzeczce zawierającej co najmniej 45% cukru.

W 1954 r. wyodrębniono nowe szczepy drożdży osmofilnych z krajowych syropów owocowych i z zagęszczonego soku gronowego, pochodzącego z Rumunii. Następnie przystąpiono do określania, które objęło 12 szczepów drożdży osmofilnych wyodrębnionych w 1952 i 11 szczepów z 1954 roku. Określanie wykonano zgodnie z metodyką podaną przez Stelling-Dekker (1931). W próbach diagnostycznych uwydatniły się wyraźne różnice między drożdżami świeżo wyodrębnionymi a drożdżami hodowanymi od 1952 roku.

Komórki drożdży wyodrębnionych w 1952 roku w 3-dniowych kulturach na brzeczce posiadały różnorodny kształt z przewagą form silnie wydłużonych o wymiarach $(2 - 5) \times (3 - 22\ \mu)$. U żadnego z tych szczepów nie otrzymano zarodników.

Komórki drożdży wyodrębnionych w 1954 roku posiadały kształt okrągły lub owalny o wymiarach (3 - 6)×(3 - 7,5 μ). U dziewięciu na jedenaście badanych szczepów zauważono wytwarzanie zarodników. Zarodniki występowały w ilości 1 - 4 w worku, posiadały kształt okrągły lub owalny, wielkość ich wynosiła 3 - 4 μ. Proces zarodnikowania poprzedzany był zazwyczaj łączeniem się dwóch komórek.

Drożdże z 1954 roku tworzyły zwykle kolonie-giganty znacznie większe od drożdży z 1952 roku (Tabl. VII).

Pod względem cech biochemicznych drożdże z 1952 i 1954 roku przedstawiały dość jednolity obraz. Wszystkie określane szczepy fermentowały glikozę, fruktozę i mannozę, a z wyjątkiem trzech szczepów — również i maltozę. Żaden z badanych szczepów nie fermentował sacharozy i laktozy, a tylko w nielicznych wypadkach zauważono bardzo nieznaczną fermentację galaktozy.

U żadnego ze szczepów nie zaobserwowano asymilacji azotu z azotanów, nie stwierdzono również wyraźnego rozwoju na alkoholu etylowym jako jedynym źródle węgla.

Na podstawie określonych cech diagnostycznych wszystkie 9 szczepów drożdży zarodnikujących zaliczyć należy zgodnie z systematyką Lodder i Kregera (1952) do gatunku *Saccharomyces rouxii*.

Odnośnie pozostałych szczepów drożdży osmofilnych, istnieje duże prawdopodobieństwo, że większość z nich należy również do gatunku *Saccharomyces rouxii*, bądź jego odmiany *Sacch. rouxii var. polymorphus*. Niestwierdzenie wytwarzania zarodników przez te szczepy wyjaśnić można by tym, że na skutek długotrwałej hodowli znajdują się one w innej fazie rozwojowej. Należy tu również podkreślić, że drożdże *Sacch. rouxii* stosunkowo trudno tworzą zarodniki. Tak na przykład spośród 9 zarodnikujących szczepów 8 wytworzyło zarodniki na ziemniaku, 7 na marchwi, 4 na płytkach gipsowych, a tylko 2 na podłożu Gorodkowej. Trzy szczepy nie fermentujące maltozy — poza tym że nie uzyskano u nich zarodników — wykazują cechy zbliżone do *Saccharomyces mellis*, który Lodder i Kreger skłonni są uważać również za odmianę *Sacch. rouxii*. Tak więc opisane wyżej drożdże osmofilne, pomimo różnego ich pochodzenia, sprowadzić by można zasadniczo do jednego gatunku *Saccharomyces rouxii* według Lodder i Kregera albo do gatunku *Zygosaccharomyces Bailii* według systematyki Kudriawcewa.

Opisane wyżej drożdże nie wytwarzają dużych ilości alkoholu i nawet w warunkach optymalnych ilość ta rzadko przekraczała 8% objętości. Temperatura optymalna fermentacji alkoholowej wynosi ok. 25°. Całkowite nasycenie środowiska cukrem (ponad 70% cukru) nie jest w stanie zahamować rozwoju drożdży. Próby fermentacyjne, nastawione na brzeczce o gęstości 30 i 60° Blg, wykazały wyraźnie hamujące działanie wyższego stężenia cukru tylko w stosunku do drożdży silniej fermentujących brzeczkę o gęstości 30° Blg, natomiast drożdże słabiej fermentujące brzeczkę o gęstości 30° Blg dawały takie same ubytki na brzeczce o gęstości 60° Blg, a w kilku wypadkach nawet większe.

Na szybkość zafermentowania syropu mają wpływ warunki tlenowe i ilość dodanych do niego komórek drożdżowych, co uwidacznia niżej podane zestawienie (syrop przechowywano w warunkach tlenowych w temperaturze 25°).

Ilość komórek drożdży dodanych na 1 ml syropu	Czas potrzebny do zafermentowania syropu
120	około 7 dni
12	około 12 dni
około 1	około 20 dni

Zastąpienie pożywki naturalnej (brzeczka) pożywką sztuczną, złożoną z soli mineralnych i cukru, nie wpłynęło zasadniczo na ilość wytworzonego alkoholu, mimo że w próbach diagnostycznych najlepszą asymilację azotu stwierdzono z peptonu.

U badanych drożdży osmofilnych stwierdzono dużą żywotność. Pozostawienie ich na tej samej brzeczce o gęstości 10° Blg na czas około 6 miesięcy, aż do zupełnego wysuszenia brzeczki, nie powoduje obumarcia wszystkich komórek.

Badane drożdże osmofilne charakteryzowały się również znaczną odpornością na działanie niektórych antyseptyków. Dodatek benzoesanu sodu, kwasu mrówkowego lub kwasu siarkawego w ilościach u nas dozwolonych nie jest w stanie zahamować rozwoju drożdży, nawet przy zawartości 65% cukru w środowisku. W próbach nad ciepłoodpornością, w których uwzględniono takie czynniki jak wiek kultury, ilość wysiewu, ilość cukru w podłożu, stwierdzono, że ogrzewanie drożdży w 60° w ciągu 5 minut wystarcza całkowicie do zabicia komórek. Zastosowanie więc niskiej pasteryzacji do syropów owocowych i niedopuszczenie do reinfekcji zapobiec może szkodliwej działalności drożdży osmofilnych.

Dalsze badania nad drożdżami są w toku.

LITERATURA

1. Kudriawcew W. I., 1954: Sistiematika drożżej. Moskwa.
2. Lodder J., Kreger-Van Rij N. J. W., 1952: The yeasts — A taxonomic study. Amsterdam.
3. Lochhead A. G., Karrel L., 1936: Effect of preservatives on fermentation and variability of sugar tolerant yeasts. *Food Research:* 517.
4. Stelling-Dekker, 1931: Die Hefesammlung des „Centralbureau voor Schimmellkultures". Cz. I: Die Sporogenen Hefen. Amsterdam.

M. Dłużewski

CHARACTERISTICS OF THE YEASTS CAUSING THE FERMENTATION OF FRUIT SIRUPS AND CONCENTRATED GRAPE JUICE

Summary

From fruit sirups and concentrated grape juice have been isolated over 20 strains of the so called osmophilic yeasts which developed in media containing over 70% of sugar. In laboratory conditions those yeasts showed a marked variability.

The characteristics of the 23 isolated strains (according to the Stelling-Dekker method) proved to be identical with those given by Lodder and Kreger for *Saccharomyces rouxii.*

It was found that the osmophilic yeasts do not produce much alcohol (seldom over 8% vol.). The effects of different agents such as temperature, sugar concentration, oxygen ect., on the course of the fermentation have been investigated. The isolated yeasts were found to be not resistant to heat but showed a marked resistance to some antiseptics. Further investigations are in course.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 245—251

M. Burbianka

WŁAŚCIWOŚCI ANTYGENOWE ENTEROTOKSYNY — CZYNNIKA TOKSYCZNEGO WYSTĘPUJĄCEGO W HODOWLACH GRONKOWCÓW

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH w Warszawie

Występujący w hodowlach gronkowców termoodporny czynnik toksyczny, który przy wprowadzeniu dożylnym i dootrzewnowym powoduje wymioty u kotów, jest utożsamiany z działającą *per os* na ludzi i małpy enterotoksyną (Davidson, Dack i Cary 1938, Surgalla 1947). Wyniki badań nad właściwościami antygenowymi enterotoksyny gronkowcowej były dotąd rozbieżne, co należy tłumaczyć brakiem metody ilościowego określania toksyny. Dolman i Wilson (1938) otrzymali surowice odpornościowe, które zmieszane z enterotoksyną neutralizowały jej działanie przy wprowadzeniu dootrzewnowym kotom. W doświadczeniach Davidsona, Dacka i Cary (1938) surowice małp uodpornionych neutralizowały działanie enterotoksyny, gdy surowica z toksyną była wprowadzona kotom dootrzewnowo, nie zobojętniały enterotoksyny, gdy mieszanka była wprowadzona dożylnie. Minnet (1938), uodparniając króliki za pomocą 2 różnych szczepów gronkowców enterotoksycznych, stwierdził, że enterotoksyna jednego szczepu ulegała zobojętnieniu przez 1/4 objętości jednej lub drugiej surowicy, enterotoksyna drugiego szczepu ulegała zobojętnieniu jedynie przez surowicę homologiczną. Surowica otrzymana przez Surgallę, Bergdolla i Dacka (1954) neutralizowała działanie koncentrowanej siarczanem amonu enterotoksyny przy wprowadzeniu doustnym małpom.

DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Rozszerzenie diagnostyki zatruć spowodowanych przez gronkowce wymagało przeprowadzenia dokładniejszych badań nad właściwościami antygenowymi enterotoksyny gronkowcowej. Praca niniejsza miała na celu otrzymanie swoistych surowic, zbadanie czy surowica otrzymana za pomocą jednego szczepu gronkowca będzie zobojętniać enterotoksynę wytwarzaną przez inne szczepy oraz czy antytoksyny zawarte w surowicy działają w sposób swoisty. Dla kontroli przeprowadzono badania z ciałami toksycznymi wytwarzanymi przez pałeczki okrężnicy i pałeczki odmieńca.

W celu znalezienia odpowiednich szczepów do uodparniania zwierząt w pierwszym etapie pracy przebadano kilkadziesiąt szczepów gronkowców na zdolność wytwarzania enterotoksyny. Badania przeprowadzano na kotach, którym ze strzykawki przesącze hodowli gronkowcowych wprowadzano dożylnie, metodą podaną uprzed-

nio (Burbianka, Pliszka i Tworek 1953). Do uodparniania królików wybrano szczepy, które regularnie tworzyły toksynę. Niektóre szczepy gronkowców po kilku przesiewach traciły zdolność wytwarzania enterotoksyny lub wytwarzały ją w słabym stopniu. Gronkowce hodowano na półpłynnym agarze na wyciągu z serc wołowych, w atmosferze powietrza z dodaniem 30-procentowego CO_2. Do uodparniania królików służyły przesącze 3-4-dniowej hodowli, odwirowane i sączone przez filtr Seitza, gotowane 30 minut, oraz przesącze nie ogrzewane lecz poddane działaniu formaliny do chwili zniknięcia właściwości hemolitycznych i toksycznych dla kotów. Przed ogrzaniem lub dodaniem formaliny w przesączu określano miano hemolityczne przy użyciu krwinek króliczych i baranich. Do 1 ml przesączu, odpowiednio rozcieńczonego roztworem fizjologicznym chlorku sodu, dodawano 0,2 ml — 5 procentowego roztworu krwinek. Pod uwagę brano całkowitą hemolizę krwinek króliczych po 1 godz. w temperaturze 37°, baranich po 1 godz. w temperaturze 37° i następnie po 24 godzinach w lodówce. W przesączu gotowanym 30 minut określano najmniejszą dawkę enterotoksyczną, to jest najmniejszą ilość toksyny, która wprowadzona dożylnie kotom wagi 2 - 3 kg powoduje u wszystkich wrażliwych kotów wymioty w czasie do 3 godzin. Dawkę tę sprawdzano przynajmniej na 4 kotach. Przy badaniu surowicy uodparnianych królików na obecność antytoksyn wprowadzano kotom dożylnie najmniejszą dawkę enterotoksyczną z różnymi ilościami badanej surowicy. Każdą dawkę surowicy sprawdzano na 2 kotach. Toksynę z surowicą wprowadzano w 1,5 ml płynu, dopełniając objętość roztworem fizjologicznym chlorku sodu. Przed wstrzyknięciem mieszaninę pozostawiano na 1 godzinę w temperaturze 37°. Brak reakcji u kotów w postaci wymiotów przyjmowano jako wskaźnik neutralizacji toksyny. Okresowo kontrolowano działanie samej toksyny bez dodatku surowicy. W surowicy króli uodparnianych określano również zawartość przeciwciał anty-hemolitycznych w oparciu o wzorcową surowicę i toksynę szczepu Wood, wytwarzającego tylko α-hemolizyny. Króle uodparniano szczepiąc podskórnie w odstępach 7-dniowych, zaczynając od dawki 0,25 ml przy gotowanych przesączach i 0,5 ml przy formalinizowanych. Dawki zwiększano stopniowo: 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 i 6,0 ml.

WYNIKI BADAŃ

Niekiedy w przesączach gotowanych 30 minut stwierdzano jeszcze małe ilości hemolizyn. Aktywność przy użyciu krwinek króliczych stwierdzono w rozcieńczeniu 1 : 10 - 1 : 20. Przesącze te jednak nie hemolizowały krwinek baranich. W przesączach hodowli nie ogrzewanych, do których dodano 0,3% formaliny i pozostawiono w temperaturze 37°, właściwości hemolityczne przy użyciu krwinek króliczych i baranich zanikały po 2 - 3 dniach, właściwości toksyczne dla kotów, jak podaje tabela I, zanikały później, dopiero po 5 - 6 dniach. Badania przeprowadzane z kilku szczepami dawały wyniki podobne. Każdy wynik kontrolowano przynajmniej na 2 kotach.

Do uodparniania królików użyto 3 szczepy gronkowców: szczep *1632/3* wyhodowany z klusek, które spowodowały zatrucie, szczep Pm_6 wyhodowany z materiału sekcyjnego dziecka zmarłego wskutek zakażenia gronkowcowego; szczep *832/4* był wyosobniony z sałatki z dorsza, która spowodowała masowe zatrucie. Szczep *1632/3* wytwarzał słabą toksynę, zawartość przeciwciał w surowicy królików uodparnianych była mała. W podanych wynikach doświadczeń z tym szczepem nie uwzględniono. Użyte do uodparniania królików przesącze hodowli szczepu Pm_6 i *832/4* oraz szczepu kontrolnego *Si* wykazywały miano hemolityczne przy użyciu krwinek króliczych — 0,0031 ml, przy baranich — 0,0062 ml. Przesącz *832/4* użyty do szczepienia z 1% tapioki wykazywał miano niższe: przy krwinkach króliczych — 0,025 ml, przy baranich — 0,05 ml. Najmniejsza dawka enterotoksyczna przesączu P_{m_6} — 0,25 ml, przesączu *832/4* — 0,6 ml. Jako surowica kontrolna służyły surowice normalne oraz surowice

Tabela I

Działanie formaliny na enterotoksynę

The influence of formaldehyd on staphylococcal enterotoxin

Okres przechowywania Days of storage	Dawka przesączu hodowli wprowadzana kotom (w ml) Dosis of culture filtrate administered to cats (in ml)			
	Ogrzewany 30 minut w 100° Heated to 100° for 30′	Reakcja Reaction	Nie ogrzewany z dodatkiem formaliny 0,3% Unheated, contajning 0,3% formaline	Reakcja Reaction
0	0,75	+		
	0,5	+		
	0,3	—		
	0,75	+	0,75	+
4	0,5	+	0,5	+
	0,3	—	0,3	—
5	0,6	+	0,6	+
6	0,6	+	0,6	—
7			1,0	—

\+ wymioty, — brak wymiotów;
\+ vomits observed, — no vomits.
Po 2 dniach przesącz z formaliną nie hemolizuje krwinek baranich i króliczych.

Tabela II

Wpływ sposobu uodparniania królików na wytwarzanie antytoksyn

The antitoxin level in rabbit sera and the mode of the immunisation

Forma użytego antygenu Antigen injected in the form:	Antytoksyczne własności surowicy (dawka zobojętniająca najmniejszą dawkę enterotoksyczną w ml) Antitoxic activity of serum (dosis of serum neutralizing minimal enterotoxic dosis in ml)				Antyhemolityczne własności surowicy (liczba jednostek anty-α-hemolitycznych w ml) Antihemolytic activity of serum (number of anti-hemolytic units per 1 ml of serum)		
	Szczep użyty do uodparniania Strain used for immunisation						
	Pm$_6$	*832/4 I*	*832/4 II**	*Si***	*Pm*$_6$	*832/4 I*	*Si***
toksyna gotowana boiled toxine	0,007	0,05	0,0005	0,5	3,3	3,0	2,7
anatoksyna anatoxine	0,01	0,05	0,0008	0,3	19,2	8,33	7,69
anatoksyna z tapioką anatoxine + + tapioca	—	0,0004	—		—	2,2	—

** króliki po miesiącu przerwy uodparniane powtórnie serią zastrzyków
rabbits were immunised for second times after one month.
* szczep nie wytwarzający enterotoksyny
strain not producing enterotoxine.

otrzymane za pomocą szczepu *Si*. Był to gronkowiec wyizolowany z ropnia, hemolizujący i koagulazododatni, nie wytwarzający enterotoksyny. Do każdego doświadczenia użyto 4 króle. Krew do badania pobierano w pierwszych doświadczeniach na 7 dzień po ostatnim zastrzyku. Ponieważ zostało stwierdzone, że ilość przeciwciał po tym czasie jeszcze wzrastała, w późniejszych doświadczeniach pobierano krew na dwudziesty dzień. Po badaniach orientujących, surowice królików, w których utworzyły się przeciwciała, mieszano razem w równych ilościach. Niektóre króliki wcale nie wytwarzały przeciwciał.

Obecność swoistych antytoksyn stwierdzano w surowicy królików uodparnianych przesączami hodowli gotowanymi oraz formalinizowanymi. Wyniki podane są w tabeli II i III. Poziom przeciwciał w surowicy króli uodparnianych jedną serią szczepień za pomocą szczepu *832/4* był niski, powtórne uodparnianie po miesięcznej przerwie taką samą serią

Tabela III

Zobojętniające działanie różnych surowic w stosunku do enterotoksyn różnych szczepów

Neutralizing effect of various antitoxic sera on enterotoxins produced by various strains

Enterotoksyna (gotowane przesącze hodowli) Enterotoxins (boiled culture filtrates)		Surowica antytoksyczna Antitoxic sera		Ilość kotów użytych na ilość kotów reagujących Number of cats used in an experiment — number of cases positive
Nazwa szczepu Name of strain	Dawka wprowadzona w ml Dosis injected ml	Przygotowana za pomocą szczepu Prepared with strain	Dawka w ml użyta do zobojętnienia ml used for neutralisation	
Pm$_6$	0,5	*Pm*$_6$	$7 \cdot 10^{-3}$	0/3
		„	$6 \cdot 10^{-3}$	2/3
		Si$_I$	1,0	1/1
		„	2,0	0/2
1 Ż	0,5	*Pm*$_6$	$7 \cdot 10^{-3}$	0/2
		„	$5 \cdot 10^{-3}$	1/2
		Si$_I$	1,0	1/1
9113	1,0	*Pm*$_6$	$2 \cdot 10^{-3}$	0/4
		„	$1 \cdot 10^{-3}$	1/2
		Si$_{II}$	0,2	1/3
		„	0,3	0/2
832/4	0,6	*832/4*	$5 \cdot 10^{-4}$	0/3
		„	$2 \cdot 10^{-4}$	1/2
		Si + 19	$8 \cdot 10^{-2}$	1/5

Szczepy *Pm*$_6$ i *832/4* wytwarzają enterotoksynę.
Króliki uodparniano przesączem gotowanym.
Szczepy Si i 19 nie wytwarzają enterotoksyny.
Si$_I$ — Króliki uodparniano przesączem gotowanym.
Si$_{II}$ — Króliki uodparniano anatoksyną.
Si + 19 Króliki uodparniano anatoksyną z mieszaniny dwóch hodowli.
Strains *Pm*$_6$ and 832/4 — enterotoxic; immunisation with boiled filtrate.
Strains *Si* and 19 — no enterotoxin.

szczepień od 0,5 do 6,0 ml spowodowało znaczny wzrost przeciwciał w surowicy. Otrzymana surowica w ilości 0,0005 ml zobojętniała najmniejszą dawkę enterotoksyczną szczepu homologicznego. Dosyć dobre wyniki oraz znaczne przyspieszenie wytwarzania przeciwciał otrzymano przy uodparnianiu królików przesączami formalinizowanymi z dodatkiem 1% tapioki. Surowice kontrolne przygotowane za pomocą szczepu nie wytwarzającego enterotoksyny oraz surowice normalne w dawkach 40 - 1000-krotnych nie neutralizowały działania toksyny (tabela III).

Dalsze doświadczenia miały na celu zbadanie, czy surowica otrzymana za pomocą jednego szczepu będzie neutralizowała enterotoksynę wytwarzaną przez inne szczepy. Badanie przeprowadzono z surowicą Pm_6, przygotowaną za pomocą przesączu ogrzewanego, oraz z 16 szczepami gronkowców. W doświadczeniach z 10 szczepami określono najmniejszą ilość surowicy niezbędną do zobojętnienia najmniejszej dawki enterotoksycznej. Wyniki podaje tabela IV. Ilość surowicy Pm_6, zobojętniająca

Tabela IV

Zobojętnianie enterotoksyny wytwarzanej przez różne szczepy gronkowców surowicą Pm_6

Neutralisation of enterotoxin produced by various strains with antitoxic serum Pm_6

Enterotoksyna nazwa szczepu i najmniejsza dawka enterotoksyczna Enterotoxin, denomination of a strain and minimal toxic dosis		Dawka surowicy Pm_6 w ml zobojętniająca enterotoksynę Amount of Pm_6 serum neutralizing minimal toxic dosis	
Pm_6	0,5		0,007
29	0,5		0,002
Goas	1,25		0,012
5	1,0		0,009
2341	1,0		0,009
4	0,75		0,05
Iż	0,5		0,007
9113	1,0		0,002
1443	0,6		0,007
832	0,6		0,03
E. coli typ a	0,5	nie zobojętniane	0,7
E. coli Nr 24	1,2	przez dawkę	0,5
Proteus	0,8	not neutralised by dosis	0,4

Surowicę Pm_6 otrzymano uodparniając króliki przesączem gotowanym.
Serum Pm_6 was collected from a rabbit immunised with boiled culture filtrate.
Surowica normalna nie zobojętniała enterotoksyny Pm_6 i *832*.
Normal serum did not neutralise enterotoxins Pm_6 and *832*.

najmniejszą dawkę enterotoksyczną, wahała się przeważnie w granicach od 0,002 do 0,009 ml. W 2 wypadkach były większe różnice; przy szczepie *832* dawka surowicy wynosiła 0,05 ml, przy szczepie Nr *4* — 0,03 ml. Badania powtórzone z różnymi partiami enterotoksyny otrzymanymi za pomocą szczepów Nr *4* i *832* potwierdziły poprzednie wyniki. Ponieważ doświadczenie z jednym szczepem wymagało szczepienia około 20 kotów.

w doświadczeniach z dalszymi 6 szczepami, z powodu braku dostatecznej ilości tych zwierząt, używano do zobojętniania toksyny dawki w ilości 0,05 ml, najwyższej, która wynikała z uprzednich badań z 10 szczepami. W każdym wypadku surowica neutralizowała działanie toksyny.

Doświadczenia Pliszkowej (1956) wykazały, że niektóre szczepy pałeczki okrężnicy oraz pałeczki odmieńca, hodowane w sposób podobny jak gronkowce, wytwarzają w hodowli termoodporny czynnik toksyczny, który po wprowadzeniu dożylnym kotom powoduje wymioty, podobnie jak enterotoksyna gronkowcowa. Próby zobojętnienia tego czynnika przez surowicę odpornościową Pm_{6} nie dały wyników dodatnich (tabela IV), co wskazuje na jego całkowitą odrębność.

Surgalla (1947) zwraca uwagę na możliwość wywołania wymiotów u kotów przez wprowadzenie dożylnie β-hemolizyny. Przesącze zawierające duże ilości β-hemolizyn, wprowadzone nie ogrzewane lub po 10 minutowym gotowaniu, powodowały wymioty. Po 30-minutowym gotowaniu nie otrzymał on nigdy wymiotów u kotów.

W moich doświadczeniach przeprowadzonych wielokrotnie ze szczepem Nr *19*, wyizolowanym z zapalenia wymienia krowy, wytwarzającym silne hemolizyny (miano hemolityczne 0,0031 ml), nie udało się nigdy wywołać wymiotów u kotów za pomocą przesączu gotowanego 30 minut. Przesącz ten wprowadzano dożylnie w ilości 2 ml.

WNIOSKI

1. Enterotoksyna pod wpływem formaliny traci własności toksyczne i przechodzi w anatoksynę.
2. Za pomocą uodparniania królików gotowanymi i formalinizowanymi przesączami hodowli gronkowców enterotoksycznych można otrzymać swoiste surowice przeciwenterotoksyczne. Uodparnianie przesączem hodowli z dodatkiem tapioki przyspiesza wytwarzanie przeciwciał.
3. Surowica otrzymana za pomocą jednego szczepu gronkowca zobojętnia działanie enterotoksyny wytwarzanej przez inne szczepy gronkowców, nie zobojętnia czynnika toksycznego wytwarzanego przez pałeczki okrężnicy i odmieńca.

LITERATURA

1. Burbianka M., Pliszka A., Tworek R., 1953: Zatrucia pokarmowe wywołane przez gronkowce, *Roczn. PZH*, **3**:356.
2. Davidson E., Dack G. M., Cary W. E.: 1938: Attempts to assay the enterotoxic substance produced by Staphylococci by parenteral injections of monkeys and kittens, *J. inf. Diseases* **62**:219.
3. Dolman C. E., Wilson J. J.: 1938: Experiments with staphylococcal enterotoxin, *J. Immunol.*, **35**:13.
4. Minett F. C.: 1938: Experiments on staphylococcus food poisoning, *J. Hyg.*, **38**:623.
5. Pliszka A., 1956. Bezpośrednie oznaczanie gronkowcowego czynnika toksycznego w wyciągach z żywności. *Acta Microbiol. Polon.*, **5**:253.
6. Surgalla M. J.: 1947: A study of the production of staphylococcal enterotoxin in chemically defined mediums. *J. inf. Diseases*, **81**:97.
7. Surgalla M. J., Bergdoll M. S., Dack G. M.: 1954: Staphylococcal enterotoxin: neutralisation by rabbit antiserum, *J. Immunol.*, **72**:398.

M. Burbianka

THE ANTIGENIC PROPERTIES OF ENTOROTOXIN — A TOXIC AGENT APPEARING IN STAPHYLOCOCCAL CULTURES

Summary

The appearance of specific antitoxins was observed in the sera of rabbits immunized with boiled and formalinized filtrates of entorotoxic staphylococci cultures. The staphylococci were cultivated on a semi-solid beef infusion agar. The titer of antibodies increased when the rabbits, after one-month interval, were repeatedly immunized. The addition of tapioca to the antigen accelerated antibody production. The minimal enterotoxic dose was neutralized with at least 0.0005 ml of the sera obtained. The enterotoxin together with the serum was administered by intravenous rout to cats. The serum obtained with the aid of one *Staphylococcus* strain neutralized the enterotoxin produced by other strains, but did not neutralize the toxic agent produced by *Escherichia coli* and *Proteus*.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 253—258

A. Pliszka

BEZPOŚREDNIE OZNACZANIE GRONKOWCOWEGO CZYNNIKA TOKSYCZNEGO W WYCIĄGU Z ŻYWNOŚCI

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH w Warszawie

U zwierząt laboratoryjnych nie można wywołać zatruć pokarmowych podając *per os* żywność zawierającą enterotoksynę gronkowcową. Toteż ogólnie przyjęta w diagnostyce zatruć gronkowcowych jest metoda pośrednia, polegająca na izolowaniu gronkowców z podejrzanej żywności i sprawdzaniu na zwierzętach toksyczności przesączów hodowli, prowadzonej w warunkach sprzyjających tworzeniu się enterotoksyny (Dack, 1949).

Większość autorów utożsamia ciepłooporny czynnik toksyczny, czynny przy wprowadzaniu parenteralnym, z działającą *per os* enterotoksyną gronkowcową — opierając się na podobnym działaniu przesączów na małpy przy wprowadzaniu doustnym i dożylnym oraz na koty przy wprowadzaniu dożylnym.

Wrażliwość zwierząt na wprowadzania dożylne jest znacznie wyższa, a dawki wprowadzane mogą być wielokrotnie mniejsze. Metoda pośrednia oznaczania toksyczności wyizolowanych szczepów nie zawsze daje jednak dobre wyniki. Nie może ona być stosowana w tych wypadkach, gdy w żywności zabito gronkowce przez ogrzewanie.

Wykrycie w żywności obecności gronkowców enterotoksycznych również nie zawsze jest dowodem, że dany pokarm spowodował zatrucie.

Minnet (1938) wprowadzał kotom dootrzewnowo wyciągi z żywności. Otrzymywał jednak wyniki dodatnie nie tylko z wyciągami z żywności zakażonej gronkowcami, ale również *E. coli*, a niekiedy z wyciągami kontrolnymi z żywności nie zakażonej. Ostatnio podobne próby przeprowadzała Stołmakowa (1954).

CEL I METODA DOŚWIADCZEŃ WŁASNYCH

Doświadczenia własne miały na celu stwierdzenie, czy czynnik toksyczny wytwarzany przez gronkowce enterotoksyczne można wykryć bezpośrednio w wyciągach z pokarmów za pomocą próby biologicznej na kotach i czy otrzymane reakcje można uważać za swoiste.

Badane wyciągi wprowadzano kotom dożylnie Za reakcję dodatnią przyjmowano wystąpienie wymiotów u kota w ciągu od ½ do 4 godzin.

Jałowe próbki żywności zakażano gronkowcami wyizolowanymi z przypadków zatruć pokarmowych. Toksynotwórczość szczepów sprawdzano poprzednio przez dożylne wprowadzanie kotom ogrzewanych przesączów hodowli na półpłynnym

Tabela I

Wytwarzanie czynnika toksycznego w żywności zakażonej różnymi szczepami gronkowców

Toxic agent in foodstuffs infected with various strains of staphylococci

Rodzaj żywności Kind of food	Szczep gronkowca użyty do zakażenia Strain of staphylococcus used for inoculation		Czas inkubacji w dniach Incubation period (days)	Ilość kotów szczepionych na ilość kotów reagujących Numerator-number of cats inoculated denominator-number of positive cases (vomits)
Gulasz wieprzowy Pork-ragout	toksyczne toxic	*1 Ż*	3	8/8
		1 Ż	2	4/4
		1632/3	2	1/0
	nietoksyczne not toxic	*Si*	3	2/0
		Si	2	1/0
	kontrola nie zakażona control (not infected)		3	2/0
			2	2/0
Gulasz wołowy Beef-ragout	toksyczne toxic	*1 Ż*	1	2/2
		1 Ż	2	2/2
		2341	2	2/1
		Mik Vos	2	2/2
		Goas	1	1/1
		Pms	2	2/1
		29/63	2	2/2
		9111	2	2/2
		9113	2	2/1
		832/4	2	6/5
	nietoksyczne not toxic	*Mik biały*	2	2/0
		Dł	2	2/0
		300	2	2/0
		18	2	2/0
	kontrola nie zakażona control (not infected)		2	4/0
Mięso końskie Horse-meat	toksyczny-104/9		2	2/2

agarze, zgodnie z metodą przyjętą w poprzedniej pracy (Burbianka, Pliszka i Tworek, 1953).

Po określonym okresie hodowli w temperaturze 37° z zakażonej żywności sporządzano wyciągi przez dodanie podwójnej ilości roztworu fizjologicznego, sączono przez sączki płócienne, odwirowywano i gotowano przez 30 minut na łaźni wodnej. Tak sporządzone wyciągi wprowadzano kotom w ilości 1 - 2 ml do żyły brzeżnej ucha.

Jako kontrolę używano wyciągu z żywności nie zakażonej, przetrzymywanej w takich samych warunkach, i z żywności zakażonej szczepami gronkowców koagulazoujemnych oraz takich gronkowców koagulazododatnich, które przy hodowli na podłożach sztucznych nie wykazywały zdolności wytwarzania enterotoksyny.

DOŚWIADCZENIA WSTĘPNE

Zbadano 11 szczepów gronkowców enterotoksycznych i 5 szczepów nie wytwarzających enterotoksyny, w tym 4 szczepy koagulazododatnie. Jako podłoża uzyto gulasz wieprzowy i wołowy. Wyniki są zebrane w tabeli I. Z 11 zbadanych szczepów enterotoksycznych 10 wytworzyło na tych podłożach czynnik toksyczny, działający na koty analogicznie jak toksyna wytworzona w półpłynnym agarze. Wyciągi z prób kontrolnych żywności nie zakażonej i zakażonej szczepami gronkowców nieenterotoksycznych nie wywoływały żadnej reakcji u kotów. Powtarzanie tych doświadczeń, przy użyciu jako podłoża innych rodzajów żywności jałowej i nie wyjałowionej (galarety z mięsa i nóżek, pasztetów, konserw rybnych, mleka i niektórych przetworów mlecznych, kluseк, tartego maku), wykazały, że gronkowce najłatwiej wytwarzają toksynę na produktach mięsnych i tartym maku. W mleku, na kilka przeprowadzonych doświadczeń, tylko w jednym wypadku udało się wykazać obecność czynnika toksycznego w przesączu. Kontrolne wyciągi z wszystkich wyżej wymienionych rodzajów żywności nie zakażonej w żadnym wypadku nie wywołały objawów chorobowych u kotów.

WPŁYW *pH*

Działanie na koty gronkowcowego czynnika toksycznego zależne było od *pH* wyciągu. Wyciągi były czynne tylko przy wartościach *pH* zbliżonych do obojętnych lub lekko alkalicznych. Przy niższym *pH* reakcja nie występowała. Jest to zgodne ze spostrzeżeniami Costlow, Cone i Garey'a (1952). Dla dokładniejszego zbadania wpływu *pH* na wytwarzanie i działanie enterotoksyny przeprowadzono doświadczenia przy użyciu półpłynnego agaru o różnym wyjściowym *pH*: 4, 5, 6, 7, 8. Agar zakażano szczepem gronkowca enterotoksycznego i hodowano według przyjętej metody, przygotowując przesącze w analogiczny sposób. Następnie sprawdzano potencjometrycznie *pH* przesączów. Otrzymane przesącze wprowadzano dożylnie kotom. Stwierdzono, że przesącze z hodowli gronkowców na agarze o wyjściowym *pH* 4, 5 i 6 nie wywoływały reakcji u kotów.

Reakcję otrzymano dopiero po zobojętnieniu przesączu z *pH* 5 i 6 do *pH* 7. Przesącz z hodowli na agarze o *pH* 4 był nieczynny i po zobojętnieniu. Przesącze z hodowli na podłożu o *pH* 7 i 8 wywoływały wymioty u kotów. Zakwaszenie tych przesączów do *pH* 5 znosiło ich działanie. Wyniki zebrane są w tabeli II. Zobojętnienie przesączów przeprowadzano przez dodatek 1/4 N NaOH, zakwaszanie 1/4 N HCl. Konieczność kontroli i korygowania *pH* w wyciągach badanych na kotach została potwierdzona również w doświadczeniach z żywnością, która spowodowała zatrucia pokarmowe u ludzi. W 2 oddzielnych przypadkach wyciągi z kaszanki, która spowodowała typowe zatrucie gronkowcowe u kilkunastu osób, wprowadzone dożylnie kotom bez zobojętnienia nie wywołały u nich objawów zatrucia. *pH* wyciągu wynosiło w jednym wypadku 5, w drugim 5.2. Po zobojętnieniu wyciągów do *pH* 7 wystąpiły u kotów typowe objawy zatrucia. Badanie bakteriologiczne kaszanki wykazało w obu wypadkach silny wzrost gronkowców enterotoksycznych. Podobnie wyciąg z nóżek w galarecie, będących przyczyną zatrucia, był nieczynny przy *pH* 5, po zobojętnieniu do *pH* 7 wywołał wymioty u kotów. Kontrolne przesącze z agaru o *pH* 5 zobojętnionego do *pH* 7 nie wywołały tych objawów.

Tabela II

Wpływ *pH* na wytwarzanie się i działanie enterotoksyny

The influence of *pH* upon production and activity of staphylococcal enterotoxin

Doświadczenie Nr Experiment No	Początkowe *pH* podłoża przed zakażeniem *pH* of a medium before inoculation	Końcowe *pH* podłoża po inkubacji Final *pH* of a medium after incubation	*pH* przesączu wprowadzonego kotu *pH* of filtrate injected to cats	Ilość kotów szczepionych na ilość kotów reagujących Numerator - number of cats inoculated denominator-number of positive cases
I	5	5,1	5,1	2/0
	5	5,1	6,5	2/2
	7	6,5	6,5	1/1
	7	6,5	5	1/0
	7,7	7,3	7,3	2/2
	4,1	3,9	3,9	1/0
II	5	5,2	5,2	1/0
	5	5,2	7,2	2/2
	6,2	6,3	6,3	2/0
	6,2	6,3	7	2/2
	7	6,8	6,8	2/2
	7	6,8	5,1	2/0
	5	5,2	7,2	2/2
	4,1	3,9	3,9	1/0
	4,1	3,9	7,2	1/0

DZIAŁANIE NA KOTY WYCIĄGÓW Z ŻYWNOŚCI ZAKAŻONEJ RÓŻNYMI RODZAJAMI BAKTERII

Próby żywności, podejrzanej o wywołanie zatrucia pokarmowego, są zwykle silnie zakażone florą mieszaną. Dlatego też przy ocenianiu możliwości zastosowania w diagnostyce bezpośredniego oznaczania enterotoksyny w wyciągach z żywności należało stwierdzić, czy inne bakterie rozwijając się w żywności nie wytwarzają substancji toksycznych, które wprowadzone dożylnie kotom wywoływałyby również wymioty. W tym celu przeprowadzono szereg prób z wyciągami z jałowego gulaszu zakażonego różnymi szczepami bakterii saprofitycznych, często spotykanych w żywności, oraz dwoma szczepami *Salmonella*. Wyciągi przygotowywano w sposób analogiczny jak przy doświadczeniach z gronkowcami. Zbadano po 2 szczepy *Cl. welchii* typ *A*, *Proteus*, *B. mesentericus*, *Str. faecalis* oraz 10 szczepów *E. coli* i szczepy *S. typhimurium* oraz *S. enteritidis*. Stwierdzono, że ogrzewane wyciągi z żywności zakażonej niektórymi szczepami *E. coli* i jednym ze szczepów *Proteus* oraz *S. typhimurium* zawierały substancje toksyczne, które wprowadzone dożylnie kotom powodowały u tych zwierząt wymioty, podobnie jak toksyna gronkowcowa. Nasuwała się więc konieczność rozróżnienia enterotoksyny gronkowcowej od substancji toksycznych wytwarzanych przez inne bakterie. W tym celu przeprowadzono próby zobojętniania badanych wyciągów za pomocą swoistej surowicy przeciwenterotoksycznej. Korzystano z surowic otrzymanych przez Burbiankę (1956). Moc otrzymanych surowic była poprzednio określona. Stwierdzono, że surowice zobojętniające entero-

Tabela III

Zobojętniające działanie swoistej surowicy antytoksycznej gronkowcowej w stosunku do czynników toksycznych wytwarzanych przez różne bakterie
Neutralisation of toxic agents produced by various bacteria with specific antistaphylotoxic serum

Szczep Strain	Podłoże Substrat	Najmniejsza dawka przesączu toksyczna dla kota w ml Minimal dosis of filtrate toxic for cats (ml)	Ilość surowicy w ml Amount of serum ml	Ilość kotów szczepionych /ilość kotów reagujących Numerator-number of cats inoculated denominator-number of positive cases
Staphylococcus Pm₆ toksyczny	Agar półpłynny Semisolid agar	0,8	0,007	2/0
E. coli Nr 24	„	1,1	0,1	2/2
E. coli typ α	„	0,5	0,1	1/1
			0,5	1/1
			0,7	1/1
Proteus	„	0,5	0,4	1/1
			0,5	1/1
			0,8	1/1
Staphylococcus	Mięso wołowe	2,0	0,002	3/0
832/4 toksyczny	Beef		0,005	1/0
E. coli typ α	„ „	2,0	0,1	3/3

toksynę gronkowcową nie zobojętniały substancji toksycznych, wytwarzanych przez pałeczki gramujemne, nawet przy zastosowaniu dawek 50 - 100-krotnie wyższych. Próby przeprowadzono z przesączem hodowli na półpłynnym agarze i wyciągami z żywności (tabela III).

Równolegle z doświadczeniami z żywnością zakażoną sztucznie, prowadzono badania z żywnością podejrzaną o wywołanie zatrucia pokarmowego u ludzi. Zbadano próby z 15 przypadków zatruć. Dodatnią reakcję kotów na wprowadzone wyciągi otrzymano w 8 wypadkach. W 5 wypadkach w posiewach otrzymano wzrost gronkowców hemolizujących, koagulazododatnich, posiadających zdolność wytwarzania enterotoksyny. W 2 przypadkach (w obu było to zatrucie makowcem) w posiewach otrzymano jedynie słaby wzrost laseczek tlenowych zarodnikujących, ale preparaty bezpośrednie z masy makowej wykazały obecność licznych drobnoustrojów: laseczek gramdodatnich i ziarniaków w dwoinkach, z przewagą ziarniaków. Objawy zatrucia miały charakter zatrucia gronkowcowego. Zanieczyszczenie maku trującymi nasionami chwastów wykluczono. Kontrolne wyciągi z prawidłowego makowca i z samego tartego maku oraz z maku tartego zakażonego sztucznie laseczką tlenową wyhodowaną z makowca, który spowodował zatrucie, nie wywołały objawów chorobowych u kotów.

Z pozostałych 7 przypadków — nie dających wyników w próbie na kotach — w dwóch stwierdzono inną przyczynę zatrucia — czad.

W 5 przypadkach nie udało się stwierdzić przyczyny zatrucia. W żadnym z tych przypadków nie znaleziono gronkowców enterotoksycznych w posiewach, a objawy chorobowe nie odpowiadały zatruciu gronkowcowemu (długi okres inkubacji, brak wymiotów).

WNIOSKI

1. Czynnik toksyczny wytwarzany przez gronkowce enterotoksyczne może być wykryty bezpośrednio w wyciągach z żywności drogą dożylnego wprowadzania wyciągów kotom.
2. Wyciągi są czynne w *pH* 6,5 do 8.
3. Niektóre szczepy pałeczek gramujemnych (*E. coli, Proteus* i *Salmonella*) wytwarzają w żywności substancje toksyczne, dające u kotów podobne objawy. Substancje te nie są zobojętniane przez swoiste surowice przeciwenterotoksyczne, jak ma to miejsce z czynnikiem toksycznym wytwarzanym przez gronkowce.

LITERATURA

1. Burbianka M., Pliszka A., Tworek R., 1953: Zatrucia pokarmowe wywoływane przez gronkowce. *Roczniki PZH,* **3a**:335.
2. Burbianka M., 1956: Właściwości antygenowe enterotoksyny — czynnika toksycznego występującego w hodowlach gronkowców. *Acta Microbiol. Polon.* **5**:251.
3. Costlow R. P., Cone F. G., Garey J. C. 1952: Studies on the production and characteristics of staphylococcus enterotoxin. *Proc. Soc. Amer. Bacteriol.,* **1**:18.
4. Dack G. M., 1949: Food Poisoning, University of Chicago Press, Chicago.
5. Minnet F. C., 1938: Experiments of staphylococcus food poisoning. *J. Hyg.,* **38**:623.
6. Stołmakowa A. N., 1954: Obrazowanije stafiłokokkowogo enterotoksyna w piszczewych produktach w usłowijach ekspierimienta. *Gig.* i *San.,* **7**:28.

A. Pliszka

THE DIRECT DETERMINATION OF STAPHYLOCOCCAL TOXIC AGENT IN FOOD EXTRACTS

Summary

It was demonstrated by intravenous injection in cats, that the toxic agent produced by the enterotoxic Staphylococci may be detected directly in food extracts. The extracts are active within *pH* limits 6,5 - 8. Some strains of *E. coli, Proteus* and *Salmonella* produce in foods the toxic substances which provoke in cats the symptoms similar to these which are observed when the staphylococcal toxic agent is injected. These substances, however, are not neutralized by the specific enterotoxic sera neutralizing the staphylococcal toxic agent.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 259—262

T. Jakubczyk

STUDIA NAD ZASTOSOWANIEM PRÓBY REDUKTAZOWEJ DO WARZYW I PRODUKTÓW WARZYWNYCH

Z Katedry Przemysłu Rolno-Spożywczego SGGW w Warszawie

Znaną od dawna w mleczarstwie próbę reduktazową zaproponował Pijanowski do określania stopnia zakażenia produktów warzywnych, głównie pomidorowych. Produkty te bowiem, ze względu na swój skład chemiczny, szczególnie łatwo podlegają fermentacji mlekowej.

Jako cel pracy postawiono sobie opracowanie metody wykorzystania próby reduktazowej do określania zanieczyszczenia drobnoustrojami owoców pomidorów i przecierów pomidorowych oraz ustalenie zależności między ilością drobnoustrojów a czasem odbarwiania błękitu metylenowego i resazuryny.

W próbie tej wykorzystana jest zdolność bakterii do obniżania potencjału oksydoredukcyjnego środowiska, w wyniku czego barwniki, takie jak błękit metylenowy lub resazuryna, ulegają redukcji przechodząc w bezbarwną postać leuko (Matuszewski i Supińska, 1939), lecz dopiero po zużyciu tlenu przez rozwijające się bakterie (Matuszewski i Pijanowski, 1935). Szybkość obniżania się potencjału i odbarwienie wskaźników uważane jest za miernik ilości i aktywności bakterii.

W celu poznania udziału poszczególnych drobnoustrojów w procesie odbarwiania, wyizolowano z powierzchni pomidorów oraz z przecierów pomidorowych większą liczbę szczepów bakteryjnych i drożdży, z których po dokonaniu diagnozy uzyskano kilkanaście typowych przedstawicieli paru grup drobnoustrojów.

Zdolność redukcyjna okazała się dość charakterystyczna i typowa dla poszczególnych grup drobnoustrojów; np. przy wyjściowej ilości 50 milionów komórek w 1 ml (wiek kultury 16 godzin) przeciętny czas odbarwiania błękitu metylenowego i resazuryny z kilkudziesięciu oznaczeń przedstawia się następująco:

	Błękit metylenowy	Resazuryna
B. subtilis	$1^h\ 20'$	1^h
E. coli i *Aerogenes*	$2^h\ 35'$	$2^h\ 15'$
Bakterie kwaszące (formy *Streptobacterium*)	$3^h\ 10'$	$2^h\ 45'$
Chromobakterie	$6^h\ 40'$	$6^h\ 30'$
Drożdże	$>15^h$	$>10^h$

Jednocześnie prowadzono każdorazowo określanie ilości drobnoustrojów przez wysiew na płytki, stosując jako pożywkę brzeczkę z agarem z dodatkiem 0,5-procentowego peptonu.

W około 80 próbach, przeprowadzonych na całych i zdrowych pomidorach rynkowych, stwierdzono, że przeciętna ilość drobnoustrojów zdjętych z powierzchni jednego pomidora o wadze około 80 g wynosi 2 - 25 milionów, co odpowiada około 25 - 300 000/gram lub 17 - 200 000/cm^2 powierzchni owocu.

Przy takim zakażeniu czas redukcji resazuryny wynosił do 8 godzin. błękitu metylenowego około — 10 godzin.

W związku ze zbyt długim czasem redukcji zastosowano preinkubację, którą wykonywano następująco: do 99 ml jałowego mleka dodawano 1 ml popłuczyn i po 16 godzinach inkubacji w temperaturze 25° dokonywano próby reduktazowej. Zastosowanie preinkubacji skróciło znacznie czas odbarwiania.

Niżej załączone zestawienie przedstawia czas redukcji błękitu metylenowego i resazuryny po preinkubacji w zależności od ilości drobnoustrojów w 1 ml popłuczyn.

Ilość drobnoustrojów		Czas redukcji	
w 1 ml popłuczyn w tysiącach	w 1 ml mleka po 16 godz. w milionach	błękit metylenowy	resazuryna
200 - 475	35 - 59	2h10′	1h50′
500 - 630	60 - 84	1h40′	1h20′
600 - 780	82 - 106	1h10′	45′
800 - 1 000	105 - 130	30′	20′
1 500 - 2 000	160 - 220	15′	10′

Przytoczone powyżej cyfry uzyskano stosując jałowe mleko, które w dalszych badaniach miało być używane jako substrat. Z zestawienia powyższego widać, że próba reduktazowa w środowisku nieselektywnym będzie w pewnym stopniu wypadkową powyższych wartości.

Przy określeniu stopnia zanieczyszczenia powierzchni pomidorów drobnoustrojami postępowano w sposób niżej podany: Pomidor myto na wyjałowionej szalce Petriego w 10 lub 15 ml jałowej wody lub jałowego roztworu anionowego środka powierzchniowo czynnego (głównie 0,7-procentowy roztwór preparatu Teepol), używając zwitka jałowej waty. Następnie 5 lub więcej ml popłuczyn dopełniano w probówkach jałowym odtłuszczonym mlekiem do łącznej objętości 10 ml. Po dodaniu 1 ml wskaźnika probówki wstawiano do łaźni wodnej o temperaturze 35°, obserwując czas redukcji.

Wskaźniki uzyskiwano przez rozpuszczenie standardowych tabletek w jałowej wodzie: resazurynę, 1 tabletkę w 50 ml wody (roztwór 0,005-procentowy), błękit metylenowy, 1 tabletkę w 200 ml wody (roztwór około 0,0035-procentowy). Jako optymalną przyjęto temperaturę łaźni — 35°, gdyż w temperaturze tej odbarwianie wskaźnika następowało najszybciej.

Prostsza w wykonaniu jest próba reduktazowa zastosowana do przecieru pomidorowego, przy czym ze względu na czerwone zabarwienie przecieru stosuje się jako wskaźnik wyłącznie błękit metylenowy.

Wykonanie: Do wyjałowionej probówki wlewa się pipetą 10 ml przecieru pomidorowego i 1 ml roztworu błękitu metylenowego. Po zamknięciu probówki jałowym korkiem zawartość miesza się, aby wyrównać natężenie zabarwienia w całości

przecieru i wstawia się do łaźni wodnej o temperaturze 35°. Pod wpływem błękitu przecier pomidorowy zabarwia się na kolor brudno zielony, dzięki czemu przejście w chwili odbarwienia jest bardzo wyraźne.

Prowadząc równocześnie analizę chemiczną przecieru pomidorowego stwierdzono, że próba reduktazowa wskazuje na rozwój i aktywność mikroflory już wtedy, kiedy analiza chemiczna nie ujawnia jeszcze żadnych zmian. Badając bowiem ten sam przecier w ciągu 30 godzin i dokonując próby reduktazowej co 3 godziny stwierdzono, że czas odbarwiania z 12 godzin na początku spadł do 5 minut po 28 godzinach. Zmiany w przyroście kwasowości stwierdzono dopiero przy czasie odbarwiania 15 minut, tj. po 24 godzinach.

Poniżej załączone jest zestawienie, przedstawiające czas odbarwiania i ilość bakterii w 1 ml przecieru, opracowane na podstawie kilkuset prób.

Czas redukcji błękitu metylenowego (w godzinach)	Ilość bakterii w 1 ml przecieru (w milionach)
15	0,050
13	0,1 - 1,2
10	0,7 - 3,8
8	7,8 - 24
6	18 - 62
4	53 - 130
2	130 - 320
1	390 - 640
0,5	650 - 1300
0,08	>1000

Z zestawienia widać, że czas redukcji błękitu jest znacznie dłuższy przy tych samych ilościach bakterii niż to ma miejsce w mleku. Przyczyną tego jest prawdopodobnie silniejsze w porównaniu z mlekiem napowietrzenie przecieru pomidorowego oraz inne właściwości środowiska.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przecierze pomidorowym zasadniczą mikroflorę stanowią bakterie fermentacji mlekowej (przeważnie formy *Streptobacterium*) i one w głównej mierze decydują o szybkości odbarwiania błękitu metylenowego.

Stwierdzono ponadto, że stosowane do konserwowania przecieru pomidorowego antyseptyki, takie jak kwas siarkawy i benzoesan sodu, nie mają większego wpływu na szybkość redukcji błękitu metylenowego. Benzoesan sodu w ogóle nie redukuje błękitu metylenowego, a kwas siarkawy w bardzo niewielkim stopniu, tak że nawet dawka 0,2% nie spowodowała odbarwienia jałowego przecieru pomidorowego w czasie krótszym niż 10 godzin.

WNIOSKI

1. Próba reduktazowa może służyć jako szybka metoda określania czystości mikrobiologicznej i aktywności drobnoustrojów w przecierach pomidorowych.

2. Przecier o niskiej zawartości bakterii odbarwia się w czasie dłuższym niż 10 godzin.

3. Przecier z wyraźnymi objawami fermentacji odbarwia się w czasie krótszym niż 30 minut.

4. Bezpośrednie zastosowanie próby reduktazowej do oznaczania zakażenia powierzchni owoców pomidora nie dało większych rezultatów ze względu na zbyt długi czas redukcji. Zastosowanie do tego celu preinkubacji daje wyniki zadowalające.

5. Stosowane w przemyśle antyseptyki (SO_2 i benzoesan sodu) nie mają większego wpływu na szybkość odbarwiania błękitu metylenowego.

LITERATURA

1. Matuszewski T., Pijanowski E., 1935: Znaczenie tlenu w przebiegu odbarwiania błękitu metylenowego przez bakterie grupy *Streptococcus lactis* w mleku jałowym. *Prace i Sprawozd. Zakł. Mikrobiol. i Przem. Roln. SGGW* XVIII.
2. Matuszewski T., Supińska J., 1939: Studies on the methylene blue reduction test. *Zentr. Bakter.*, II, **101**:45.

J. Jakubczyk

ON THE APPLICATION OF THE REDUCTASE TEST FOR VEGETABLES AND VEGETABLE PRODUCTS

Summary

The reductase test used in the routine milk control has been applied for determination of microbial contamination of tomatoes and tomato products.

On the whole, it was found that the stronger the infection of tomatoes and tomato products, the sooner the discoloration of the dyes (methylene blue or resazurine).

A number of typical strains of bacteria isolated from tomatoes have been analysed for their reducing capacity. *Bacillus subtilis, Escherichia, Aerobacter aerogenes* and lactic acid bacteria were found to be the best reducers. Chromobacteria and yeasts showed much lower reducing capacity. While determining the contamination of tomato surface, sterile milk as an substrate was found helpful.

For comparative purposes some chemical determinations (dry matter, total sugars, total and volatile acidity, alcohol content) and bacteria plate count have been made.

Is was possible to establish a fair correlation between the time of reduction and the number of bacteria present.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 263—266

A. Horubała

ZASTOSOWANIE ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH DO USUWANIA DROBNOUSTROJÓW Z SUROWCÓW OWOCOWYCH I WARZYWNYCH

BADANIA WSTĘPNE

Z Katedry Przemysłu Rolno-Spożywczego SGGW w Warszawie

Celem pracy było użycie środków powierzchniowo czynnych typu anionowego do mycia surowców owocowych i warzywnych, przy czym chodziło tu nie tylko o zmniejszenie ilości mikroflory znajdującej się na powierzchni surowców, ale w poważnym stopniu i o zmniejszenie zanieczyszczenia mechanicznego surowców. Dotychczasowe sposoby mycia z zastosowaniem tylko wody nie zawsze odpowiadają wymogom, jakie stawia surowcom nowoczesny przemysł owocowo-warzywny. Surowiec myty tylko wodą nadal zatrzymuje na sobie zazwyczaj wielką ilość drobnoustrojów, które mogą wpływać w różny sposób zarówno na sam przebieg procesów technologicznych, jak i na produkt końcowy. Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych wydaje się szczególnie ważne w stosunku do tych surowców, przy myciu których nie można zastosować czynnika mechanicznego. Dotyczy to więc surowców miękkich, mogących łatwo ulec uszkodzeniu, takich jak truskawki, maliny, grzyby itp.

W literaturze w ostatnich latach natknięto się na przykłady zastosowania związków powierzchniowo czynnych typu anionowego do mycia truskawek i ogórków (Haynes, Harlin, Mundt i Stokes 1953, Fabian i Jacobs, 1951).

W niniejszej pracy jako surowców użyto: truskawki, śliwki, grzyby, szczaw, szpinak, pomidory i fasolkę szparagową.

Jako środki myjące stosowano głównie roztwory mydła potasowego oraz niektóre syntetyczne środki powierzchniowo czynne jak teepol, syntopal B, neocal, syntapon L, syntapon CP.

Przy wyborze środka powierzchniowo czynnego uwzględniano następujące momenty:

a) brak ujemnego wpływu na cechy organoleptyczne mytych surowców (również słaby i nieodrażniący zapach samego preparatu),

b) łatwą usuwalność z powierzchni przy pomocy wody,

c) niewysokie koszty stosowania.

Dla sprawdzenia efektu myjącego stosowano następujące oznaczenia:

a) ilość drobnoustrojów przechodzących do roztworu myjącego i pozostających na surowcu,

b) popiół nierozpuszczalny w 10-procentowym HCl, pozostający na surowcu,
c) ilość wyługowywanych barwników,
d) ilość ekstraktu przechodzącego do roztworu,
e) ocenę organoleptyczną.

Obliczenie ilości drobnoustrojów wykonano metodą płytkową. Jako pożywki stosowano odpowiednie wyciągi roślinne, jednak najlepsze rezultaty osiągano przy zastosowaniu 7% brzeczki agarowej z dodatkiem 0,5-procentowego peptonu.

Przy stosowaniu środka powierzchniowo czynnego uwzględniano następujące czynniki: 1) różne stężenia środka powierzchniowo czynnego, 2) roztwór środka powierzchniowo czynnego + środek alkaliczny, 3) roztwór środka powierzchniowo czynnego + środek zmiękczający wodę, 4) roztwór środka powierzchniowo czynnego + środek alkaliczny i zmiękczający wodę.

Porównując wpływ stężenia środka powierzchniowo czynnego na jego efekt myjący stwierdzono, że w przypadku użycia mydła najodpowiedniejszy z punktu widzenia ekonomiczno-technologicznego jest roztwór 0,2 - 0,3-procentowy, który dawał obniżenie napięcia powierzchniowego do około 40 dyn/cm. Dalsze zwiększanie stężenia roztworu mydła nie dawało efektu; np. 0,5 - 1 i nawet 5-procentowy roztwór mydła dawał obniżenia napięcia powierzchniowego do 33 dyn/cm, zaś 0,25-procentowy do 41 dyn/cm i 0,125-procentowy do 56 dyn/cm. Syntetyczne środki powierzchniowo czynne wykazywały na ogół przy tym samym stężeniu co mydło wieksze obniżenie napięcia powierzchniowego. Dla osiągnięcia jednak takiego samego efektu myjącego konieczne było stosowanie większego stężenia od 0,25 do 0,5, a nawet 1%.

Dodatek środka alkalizującego środowisko, zwykle w postaci ługu sodowego, polepszał prawie zawsze efekt myjący w wypadku stosowania syntetycznych środków powierzchniowo czynnych, jednak wydaje się, że najkorzystniejsze (w szerszym znaczeniu) *pH* roztworu myjącego leży w granicach 7,0 - 7,5. W przypadku śliwek i pomidorów nie uszkodzonych lepsze efekty osiągnięto przy stosowaniu roztworu o *pH* 7,5 - 8,0. Silniejsza alkalizacja środowiska myjącego powoduje wymywanie barwników zawartych w owocach i warzywach.

Zmiękczanie wody przez związanie jonów Ca i Mg wyraźnie przyczynia się do obniżenia napięcia powierzchniowego przez roztwory mydła potasowego o stężeniu do 0,3%.

Przy wyższych stężeniach mydła w wodzie wodociągowej — twardej — efekt usuwania drobnoustrojów zmniejsza się mimo niskiego napięcia powierzchniowego, prawdopodobnie na skutek osadzania się na owocach nierozpuszczalnych mydeł wapniowych, a wraz z tym pewnych ilości drobnoustrojów. Zwiększa się również ilość popiołu nierozpuszczalnego w 10-procentowym HCl w stosunku do tych surowców, które myte były w wodzie destylowanej lub zmiękczanej, o tym samym stopniu obniżenia napięcia powierzchniowego; np. truskawki dają w takich wypadkach o 40 - 50% więcej popiołu nierozpuszczalnego w 10-procentowym HCl oraz o około 100% więcej drobnoustrojów, które pozostały na owocach. Z niekorzystnym zjawiskiem spotkano się przy myciu śliwek i pomidorów w roztworach mydła potasowego w wodzie nie zmiękczonej. Dają one niekiedy na powierzchni żywiczny nalot o nieprzyjemnym wrażeniu przy dotyku. Mycie w wodzie destylowanej lub zmiękczanej zazwyczaj takiego osadu nie dawało.

Przy stosowaniu pozostałych syntetycznych środków powierzchniowo czynnych twardość wody nie wywierała wpływu na efekt mycia owoców i warzyw. Zastosowanie kombinacji w postaci środka powierzchniowo

czynnego ' środek zmiękczający + środek alkalizujący nie dało lepszych rezultatów niż zestawienia omówione poprzednio.

Przy badaniu wpływu czasu oddziaływania środka powierzchniowo czynnego na usuwanie drobnoustrojów z surowca stwierdzono, że najlepszy skutek mycia owoców twardych, jak śliwki i pomidory, osiąga się w czasie 30 sekund, przy umiarkowanym ruchu mechanicznym, zaś w ciągu około 10 - 15 sekund przy wstrząsaniu bardziej energicznym powodującym pienienie się. Owoce miękkie, nie znoszące energicznego mieszania, wymagają czasu nieco dłuższego, nie przekraczającego jednak 1 minuty.

W przypadku mydła lepsze efekty osiągano przy stosowaniu mechanicznego poruszania płynu, które powodowało tworzenie się piany. Przy stosowaniu syntetycznych środków powierzchniowo czynnych piana nie była istotnym warunkiem dobrego mycia i usuwania drobnoustrojów, lecz ruch mechaniczny płynu przyspieszał proces mycia.

Straty ekstraktu w surowcach posiadających nie uszkodzoną tkankę były takie same jak w próbach kontrolnych (mytych wodą). W surowcach przejrzałych i uszkodzonych następowało silniejsze rozluźnienie tkanek i straty ekstraktu nieco zwiększały się.

Wyniki stosowania środków powierzchniowo czynnych do mycia poszczególnych surowców:

a) Truskawki. Praktycznym efektem zastosowania związków powierzchniowo czynnych jest przede wszystkim kilkakrotne zmniejszenie ilości popiołu nierozpuszczalnego w 10-procentowym HCl w porównaniu z surowcem mytym w wodzie. Stosunek ilości usuniętych drobnoustrojów w próbach równoległych (woda oraz woda + środek powierzchniowo czynny) waha się w bardzo szerokich granicach, najczęściej od 1 do 3. Surowiec twardy, nie rozpadający się, myje się na ogół dość dobrze i nie przyjmuje zapachu i smaku środka myjącego. Surowiec rozpadający się, w którym straty ekstraktu są duże, przyjmuje niekiedy zapach i smak obcy, który można usunąć przez silniejsze płukanie wodą. Dotyczy to szczególnie teepolu i neocalu. Środowisko alkaliczne powoduje częściowo wyługowywanie niektórych barwników, przez co truskawki przybierają zabarwienie bardziej żywe.

b) Śliwki. Mycie wodą bez zastosowania czynnika mechanicznego powoduje usunięcie przede wszystkim prawie wszystkich pleśni. Drożdże a szczególnie bakterie lepiej zmywają się roztworami mydła lub innych środków powierzchniowo czynnych. Przy stosowaniu roztworów mydła w wodzie nie zmiękczonej zachodzi możliwość wytrącenia się osadu. Ilość drobnoustrojów usuwanych przy pomocy wody jest zawsze mniejsza niż zmywanych roztworami środków powierzchniowo czynnych, z wyjątkiem słabych roztworów mydła o stężeniu 0,2% i poniżej w wodzie twardej. Wypłukiwania barwników nie obserwowano. Najlepsze efekty osiągano przy użyciu 0,5-procentowych roztworów mydła lub odpowiednich środków powierzchniowo czynnych.

c) Ilość drobnoustrojów usuwanych ze szpinaku i szczawiu przy myciu woda jest prawie zawsze niższa niż przy myciu w roztworach środków powierzchniowo czynnych. Ilość pozostałego popiołu nierozpuszczalnego w 10-procentowym HCl jest również wyższa w próbach mytych tylko wodą. Przy stosowaniu roztworów alkalicznych daje się zauważyć silniejsze wypłukiwanie chlorofilu i karotenoidów, szczególnie przy blanszowaniu surowca niedostatecznie wypłukanego z roztworu myjącego.

d) Mycie pomidorów w roztworach środków powierzchniowo czynnych usuwa więcej drobnoustrojów z powierzchni (bez ubocznych wpływów na jakość surowca) niż mycie samą wodą.

e) Grzyby o dużej ilości zanieczyszczeń gliniastych dają się bardzo dobrze myć środkami powierzchniowo czynnymi, dzięki czemu zmniejsza się znacznie ilość ogólna popiołu; np. grzyby myte wodą dały średnio z kilkunastu prób 1,9%, a myte 0,5-procentowym roztworem mydła 0,79% popiołu ogółem. Ilość usuwanych drobnoustrojów jest przeciętnie o 15 - 20% wyższa niż przy użyciu wody. Wyraźnego wpływu na barwę i zapach nie zauważono.

WNIOSKI

1. Zastosowanie powierzchniowo czynnych anionoaktywnych związków do mycia surowców owocowo-warzywnych jest korzystne i celowe, ponieważ: a) usuwają one większą ilość drobnoustrojów niż zwykła woda, b) usuwają więcej zanieczyszczeń mechanicznych.

2. Szczególnie korzystne jest stosowanie tych związków do truskawek, pomidorów, śliwek i grzybów.

3. Ze względu na stosunkowo silne wypłukiwanie barwników karotenoidowych stosowanie związków powierzchniowo czynnych typu anionowego do warzyw liściastych wydaje się mniej korzystne.

LITERATURA

1. Haynes R. D., Harlin H., Mundt J. O., Stokes R. 1953: Detergents effective in removing mold from fruit. *Food. Eng.* 25:87.
2. Fabian F. W., Jacobs P. D., 1951: Detergent unnecessary picklers Find. *Food Packer* 32.66.32.

A. Horubała

THE USE OF THE SURFACE ACTIVE AGENTS FOR REMOVING MICROORGANISMS FROM SURFACE OF FRUITS AND VEGETABLES

Summary

Some anionic surface active agents have been studied for their capacity of the removing of microorganisms and dirt from raw fruits and vegetables such as strawberries, plums, snap beans, sorrel, spinach, tomatoes and mushrooms. As the washing agents the solutions of potassium soap and some synthetic surface active agents such as teepol, syntopal B, neocal etc. were used, and the surface tension was lowered to about 40 dyn/cm. A satisfactory removal of microorganisms from soft fruits (strawberries), from fruits possesing a wax cover (plums) and from mushrooms was obtained, the number of microorganisms removed by the use of detergents being sereval times higher than that removed with water alone. The use of detergents enabled to lower very markedly the content of acid insoluble ash owing to a better removal of surface dirt from fruits and vegetables.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 267—270

W. Moycho i *W. Gromska*

ANTAGONIZM WYSTĘPUJĄCY W MLEKU MIĘDZY *STREPTOCOCCUS LACTIS* A *BACILLUS SUBTILIS* I *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

Z Zakładu Fizjologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi

W mleku świeżo dojonym występuje początkowo mikroflora bardzo różnorodna, która jednak po pewnym czasie ujednostajnia się w ten sposób, że środowisko to zostaje opanowane prawie wyłącznie przez bakterie mlekowe. Proces ten przypisuje się ogólnie obecności kwasu mlekowego, wytwarzanego przez bakterie mlekowe. Jednak kwas mlekowy nie odgrywa wyłącznej roli w tym procesie.

Whitehead (1933) podaje, że czynnikiem hamującym rozwój niektórych bakterii jest obok kwasu mlekowego substancja bakteriostatyczna o charakterze białkowym.

Hirsch i Mattick (1944) oraz Mattick i Hirsch (1947) wyodrębnili z kultur *Str. lactis* substancję, którą udało się otrzymać w stanie czystym, nazwaną przez nich nizyną. Substancja ta wykazuje własności antybiotyczne, szczególnie w stosunku do bakterii gramdodatnich. Według badań Berridge'a, Newtona i Abrahama (1952) oraz Newtona i Abrahama (1953) nizyna zawiera 4 polipeptydy, w skład których wchodzi do 12 aminokwasów. Wyróżnili oni 4 rodzaje nizyn: A, B, C i D. Najaktywniejsze są nizyny A i B, jeszcze w rozcieńczeniu 10^{-8}, 10^{-9}, hamujące wzrost *Str. agalactiae* i *Str. cremoris* (Berridge 1949). Mattick i Hirsch (1947) stwierdzają, że nizyna działa na liczne bakterie, jak: *Staphylococcus, Streptococcus, Pneumococcus, Neisseria, Bacillus, Clostridium, Lactobacillus, Mycobacterium* i inne.

W pracy z r. 1953 Hirsch opisuje zastosowanie paciorkowców produkujących nizynę do zahamowania niepożądanej fermentacji przy produkcji serów.

Zadaniem niniejszej pracy było zbadanie hamującego działania *Str. lactis* w mleku w stosunku do *B. subtilis* i *P. fluorescens*. Chodziło mianowicie o stwierdzenie, czy głównym czynnikiem hamującym wzrost tych bakterii jest produkowany przez *Str. lactis* kwas mlekowy, czy też produkowany przez tenże drobnoustrój antybiotyk nizyna.

DOŚWIADCZENIA I WYNIKI

Kwas mlekowy wytwarzany przez *Str. lactis* zobojętniano za pomocą kwaśnego węglanu sodu ($NaHCO_3$), utrzymując *pH* mleka na poziomie 6,8 - 7,0.

Badania miały charakter jakościowy i ilościowy.

1. Badania jakościowe na podłożach stałych:

Na szalki Petriego wylewano agar mleczny. Po usunięciu z zastygłego podłoża paska środkowego o szerokości 1,5 - 2 cm, wlewano do rynienki w ten sposób utworzonej agar mleczny trojakiego rodzaju:

kombinacja a): z 24-godzinną hodowlą *Str. lactis*,

kombinacja b): z 24-godzinną hodowlą *Str. lactis* i z dodatkiem $NaHCO_3$,

kombinacja c): jałowy agar mleczny z dodatkiem kwasu mlekowego w ilości około 1%.

Płytki zaszczepiano następnie powierzchniowo 24-godzinną hodowlą *B. subtilis* lub *P. fluorescens*, po czym umieszczano je na 24 - 48 godzin w temperaturze około 30°.

Po upływie tego czasu stwierdzono, że w kombinacji a): *B. subtilis* rozwinął się tylko na bocznych polach (brak rozwoju na pasku środkowym) (Fot. 1, Tabl. VIII — po str. 272). Na zahamowanie wzrostu mógłby tu wpłynąć zarówno kwas mlekowy, jak i antybiotyk. W kombinacji b): silny rozwój *B. subtilis* na bocznych polach, wyraźne zahamowanie wzrostu bakterii na pasku środkowym (Fot. 2, Tabl. VIII). Wobec zobojętnienia tu kwasu mlekowego przez $NaHCO_3$ — zahamowanie wzrostu należy przypisać jedynie antybiotykowi. W kombinacji c): *B. subtilis* nie rozwinął się na pasku środkowym, podobnie jak w kombinacji a) (hamujące działanie kwasu).

Doświadczenia te powtórzono na skosach agarowych. Do agaru z mlekiem lub serwatką wsiewano hodowlę *Str. lactis* z $NaHCO_3$; po skoszeniu rozprowadzono na powierzchni agaru *B. subtilis*. Zaobserwowano wyraźne zahamowanie wzrostu *B. subtilis* (Fot. 3, Tabl. VIII).

Identyczne doświadczenia przeprowadzano z wpływem antybiotyku wydzielanego przez *Str. lactis* na *P. fluorescens*. Działanie to jest wyraźnie słabsze.

Z doświadczeń powyższych wynika, że w obecności *Str. lactis*, nawet po wyeliminowaniu kwasu mlekowego, wzrost *B. subtilis*, a w słabszym stopniu także i *P. fluorescens*, ulega zahamowaniu.

Zaobserwowano również, że antybiotyk nie dyfunduje do agaru przy *pH* około 7, co jest zgodne z wynikami otrzymanymi przez Matticka i Hirscha (1947). Działanie antybiotyku ogranicza się tylko do obszaru wzrostu paciorkowca. Na tym obszarze działa prawdopodobnie tylko pewna część antybiotyku, znajdująca się w bezpośrednim kontakcie z bakteriami wrażliwymi.

Z tego powodu w dalszej pracy do ilościowego oznaczania aktywności antybiotycznej *Str. lactis* używano podłoża płynnego.

2. Badania na podłożach płynnych:

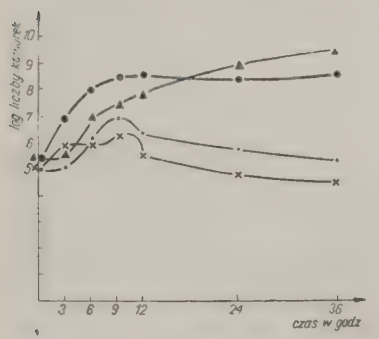
Obserwacje dotyczyły przebiegu rozwoju *Str. lactis* i *B. subtilis* lub *P. fluorescens* i polegały na oznaczaniu liczby komórek w kulturach zarówno czystych, jak i mieszanych (*Str. lactis* + *B. subtilis* i *Str. lactis* + *P. fluorescens*).

Hodowle prowadzono na mleku z $NaHCO_3$ oraz kontrolne, bez tego odczynnika.

W hodowlach mieszanych (*Str. lactis* + *B. subtilis* + $NaHCO_3$) krzywa wzrostu *B. subtilis* wykazuje wyraźne załamanie. Ilość komórek po 9 godzinach hodowli wynosiła $14 \cdot 10^6$ na 1 ml. Po 36 godzinach hodowli ilość drobnoustrojów malała do $0{,}5 \cdot 10^6$ na 1 ml. W hodowlach bez $NaHCO_3$ po 9 godzinach hodowli następowało silniejsze załamanie krzywej wzrostu. Maksymalna ilość komórek była w tym przypadku trzykrotnie mniejsza i wynosiła po 9 godzinach około $3 \cdot 10^6$ komórek na 1 ml, a po 36 godzinach około $0{,}15 \cdot 10^6$.

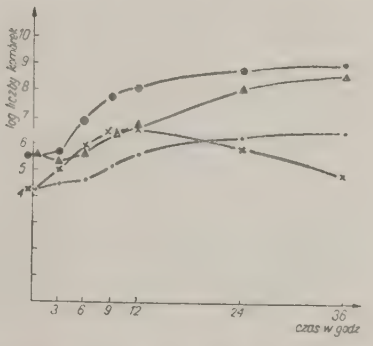
Wyniki te ilustruje wykres (rys. 1).

Przebieg krzywych wzrostu *B. subtilis* i *Str. lactis* w hodowlach z $NaHCO_3$ był podobny do przebiegu normalnych krzywych wzrostu tych



Rys. 1. Wpływ *Str. lactis* na rozwój *B. subtilis* w hodowli mieszanej

Fig. 1. The influence of *Str. lactis* upon the growth of *B. subtilis* in mixed culture



Rys. 2. Wpływ *Str. lactis* na rozwój *P. fluorescens* w hodowli mieszanej

Fig. 2. The influence of *Str. lactis* upon the growth of *P. fluorescens* in mixed culture

● — ● — *Str. lactis*,
× — × — *B. subtilis*,
▲ — ▲ — *Str. lactis* } hodowla z
· — · — *B. subtilis* } $NaHCO_3$

● — ● — *Str. lactis*,
× — × — *Ps. fluorescens*,
▲ — ▲ — *Str. lactis* } hodowla z
· — · — *Ps. fluorescens* } $NaHCO_3$

bakterii bez kwaśnego węglanu sodu. Dodatek $NaHCO_3$ wpływał jedynie na opóźnienie rozwoju *B. subtilis*, jednak nie spowodował nagłego załamania krzywej, jak to miało miejsce w hodowli mieszanej.

W stosunku do *P. fluorescens* stwierdzono jedynie nieznaczne zahamowanie rozwoju spowodowane antybiotykiem, co potwierdzałoby wyniki uzyskane na podłożu stałym (rys. 2).

W preparatach mikroskopowych, wykonanych z hodowli mieszanych (*B. subtilis* + *Str. lactis* + $NaHCO_3$) udało się kilkakrotnie zaobserwować początek rozpadu komórek *B. subtilis* przy czym komórki takie zawsze stawały się gramujemne.

Jest to zrozumiałe wobec faktu, że liza niszczy błonę bakteryjną, a dyfuzja substancji cytoplazmatycznych do środowiska pociąga za sobą zniszczenie komórki (Shugar 1954).

Odczyn według Grama u *B. subtilis* zmieniał się z dodatniego na ujemny o wiele wcześniej niż pojawiała się liza.

Streszczenie wyników:

Kwas mlekowy wydzielany przez *Str. lactis* w mleku jest głównym czynnikiem hamującym rozwój *B. subtilis* i *P. fluorescens*. Jednak obok kwasu mlekowego występuje także hamujące działanie czynnika antybiotycznego, wydzielanego przez *Str. lactis*, prawdopodobnie nizyny, silniejsze w stosunku do *B. subtilis* a słabsze w stosunku do *P. fluorescens*. Pod wpływem czynnika antybiotycznego *B. subtilis* traci swą gram-pozytywność.

LITERATURA

1. Berridge N. J., 1949: Preparation of the antibiotic nisin, *Biochem. J.*, **45**: 486.
2. Berridge N. J., Newton F., Abraham E. P., 1952: Purification and nature of the antibiotic nisin. *Biochem. J.*, **52**: 529.
3. Hirsch A., 1953: Antibiotics in food preservation. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.*, **16**: 100 (z „Antybiotyki iz bakterii", Moskwa, 1954).
4. Hirsch A., Mattick A. T. R., 1944: A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature*, **154**: 551.
5. Mattick A. T. R., Hirsch A., 1947: Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci., *Lancet*,: 5.
6. Newton F., Abraham E. P., 1953: *Nature*, **171**: 606.
7. Shugar D., 1954: Istota i mechanizm barwienia wg Grama, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **8**: 87.
8. Whitehead H. R., 1933: A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci., *Biochem. J.*, **27**: 793.

W. Moycho and *W. Gromska*

ANTAGONISTIC ACTION OF *STREPTOCOCCUS LACTIS* AGAINTS *BACILLUS SUBTILIS* AND *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*, OBSERVED IN MILK

Summary

The authors investigated the influence of *Streptococcus lactis* on *B. subtilis* and *P. fluorescens* in mixed cultures in milk media (milk-agar, whey-agar, milk and whey).

They effect of lactic acid produced in these media by streptococci was eliminated by neutralisation of substrate with $NaHCO_3$.

The observed inhibition of growth was then due only to an antibiotic produced by *Str. lactis*. The growth of *B. subtilis* was inhibited markedly; *P. fluorescens* was relatively resistant.

There was a change of gram reaction of some bacilli under the influence of the antibiotic.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 271—275

E. Lipińska

MIKROBIOLOGICZNE METODY ZAPOBIEGANIA WADOM SERA WYWOŁYWANYM PRZEZ BAKTERIE KWASU MASŁOWEGO

Z Pracowni Biochemicznej Instytutu Przemysłu Mleczarskiego w Warszawie

Przetrwalnikujące beztlenowce są szkodnikami w serowarstwie. Wywołują one tzw. wtórne wzdęcia sera, objawiające się przez nieregularne oczkowanie, szczeliny, wnęki, pęknięcia oraz silnie odrażający smak i zapach.

Według danych z piśmiennictwa najszkodliwsze dla serowarstwa jest *Clostridium tyrobutyricum* fermentujące mleczany (van Beynum i Pette, 1935).

Powstawanie fermentacji masłowej w serze nie jest dotychczas zjawiskiem całkowicie wyjaśnionym. Brak jest ścisłej zależności pomiędzy ilością tych bakterii w serze a występowaniem objawów fermentacji (Dorner, Demont i Chavanes, 1942). Należy przypuszczać, że o występowaniu fermentacji w serze decyduje zespół czynników, związanych z właściwościami środowiska, warunkujący kiełkowanie przetrwalników.

Nowe perspektywy zwalczania fermentacji masłowej w serach otwarte zostały w wyniku badań Matticka i Hirscha (1947) oraz Oxforda (1944) nad antybiotykami wytwarzanymi przez paciorkowce mleczne. Antybiotyk ten, albo raczej antybiotyki, gdyż opisano już kilka różniących się między sobą, zostały między innymi zastosowane przy wyrobie sera do zwalczania fermentacji masłowej (Clintock, Serres, Mazolf, Hirsch i Mocquot, 1952; Hirsch *et al.* 1951; Pette i Koody, 1953).

Podjęte badania nad zwalczaniem fermentacji masłowej w serach zmierzały do wyizolowania odpowiedniego szczepu *Str. lactis*, sprawdzenia w skali laboratoryjnej jego przydatności dla zamierzonych celów, wreszcie sprawdzenie jego działalności w normalnych warunkach wyrobu sera.

Ogółem przebadano 150 próbek mleka, z których wyizolowano 30 szczepów, wykazujących w próbie orientacyjnej właściwość wytwarzania substancji antybiotycznych. Spośród nich 4 szczepy stosunkowo najsilniej hamowały wzrost wzorcowego szczepu *Staph. aureus 209-P*.

Cechy morfologiczne, właściwości biochemiczne i serologiczne, a w szczególności obecność wielocukru *C* swoistego dla tej grupy, pozwoliły uznać wyizolowane szczepy za paciorkowce mleczne z grupy *N*. Szczep noszący numer kolejny *91* odznaczał się dużą szybkością ukwaszania. Ze względu na ważność tej cechy w praktycznych warunkach

wyrobu sera, szczep ten użyto do dalszych doświadczeń. Oznaczenia aktywności antybiotycznej przeprowadzano w opisanych poniżej doświadczeniach w serwatce, oddzielonej przez 5-minutowe ogrzewanie w temp. 100° od hodowli szczepu *91* w mleku odtłuszczonym.

W celu określenia najkorzystniejszego dla wytwarzania antybiotyku czasu inkubacji poddano hodowle szczepu *91* w mleku odtłuszczonym inkubacji przez 24, 48, 72 godzin w temperaturze 30°. Strefy zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego uzyskane po tych czasach inkubacji poddano analizie wariancyjnej według trójkierunkowej klasyfikacji z uwzględnieniem wpływu rozcieńczenia antybiotyku. Pozwoliło to stwierdzić, że przeciętna zawartość antybiotyku jest jednakowa przy stosowanych w tych doświadczeniach czasach inkubacji.

Badania nad zawartością antybiotyku w hodowlach szczepu *91*, poddanych działaniu temperatur zbliżonych do stosowanych przy wyrobie sera ementalskiego i groyer, wykazały, że ta część populacji bakteryjnej, która przetrwała działanie omawianych temperatur, wytwarza antybiotyk w ilościach mniejszych niż w temperaturach normalnie stosowanych. W temperaturach wyrobu sera groyer szczep *91* wytwarza około 60%, a w temperaturach wyrobu sera ementalskiego około 25% ilości antybiotyku, wytwarzanego w warunkach optymalnych.

Wrażliwość niektórych bakterii fermentacji kwasu mlekowego i szczepionek czystych kultur na działanie antybiotyku określano na przykładzie szczepów *Thermobacterium helveticum, Th. bulgaricum, Streptobacterium casei, Str. thermophilus, Str. diacetilactis, Str. cremoris* oraz szczepionek czystych kultur maślarskich i do wyrobu sera edamskiego. Wyniki oznaczeń wrażliwości badanych szczepów i zakwasów, wyrażone w mm średnicy stref zahamowania ich rozwoju przez podłoże sfermentowane, nierozcieńczone i rozcieńczone w stosunku 1 : 2, przedstawione są w tabeli I. Umieszczono w niej także wyniki oznaczeń wrażliwości dwóch szczepów *Str. agalactiae*.

Tablica VIII

Do pracy: Moycho i Gromska, str. 267

Fot. 1. Hamowanie wzrostu *Bacillus subtilis* przez *Streptococcus lactis* (pas środkowy) na agarze mlekowym niezobojętnionym.
Fot. 2. To samo na agarze mlekowym zobojętnionym przy pomocy $NaHCO_3$.
Fot. 3. Wzrost *B. subtilis* na agarze mlekowym: *a* — z *Str. lactis* — bez $NaHCO_3$, *b* — z *Str. lactis* i z $NaHCO_3$, *c* — bez *Str. lactis*.

Do pracy: Lipińska, str. 271

Fot. 4. Sery edamskie zakażone bakteriami fermentacji masłowej: u góry — szczepione *Str. lactis No 91*, u dołu — nieszczepione.

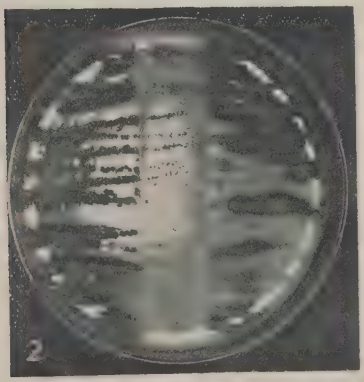
Table VIII

To the paper by Moycho and Gromska, p. 267

Phot. 1. The inhnbntion of growth of *B. subtilis* by *Str. lactis* on milk agar
Phot. 2. The inhibition of growth of *B. subtilis* by *Str. lactis* on milk agar neutralised with $NaHCO_3$
Phot. 3. Growth of *B. subtilis* on milk agar slants: *a* — +*Str. lactis*, without $NaHCO_3$, *b* — +*Str. lactis*, with $NaHCO_3$, *c* — in pure culture

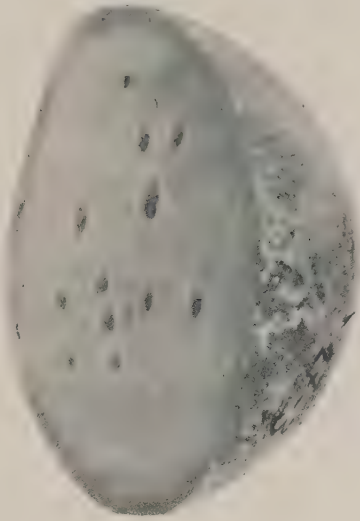
To the paper by Lipińska, p. 271.

Phot. 4. Edam type chees infected with butyric acid bacteria; upper one — inoculated with antibiotic strain Nr. 91, lower one — not inoculated.



3

a b c



4

Wrażliwość na antybiotyk różnych bakterii fermentacji kwasu mlekowego nie jest jednakowa. Najwrażliwsze okazały się szczepy *Th. helveticum* i *Str. thermophilus*. Spośród badanych paciorkowców mezofilnych największą wrażliwość na działanie antybiotyku wykazał *Str. diacetilactis*. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych przez innych autorów (np. Hirsch, 1951) badane szczepy *Str. cremoris* i *Str. agalactiae* odznaczały się stosunkowo słabą wrażliwością. Spośród badanych zakwasów mleczarskich, szczepionka służąca do wyrobu sera edamskiego była wrażliwsza niż zakwas maślarski.

Tabela I

Wrażliwość badanych szczepów i zakwasów na działanie antybiotyku (średnice stref zahamowania w mm)

Susceptibility of tested strains to antibiotic substance (Diameter of inhibition zones in mm)

	Thermobact. helveticum	*Str. thermophilus*	*Str. diacetilactis*	*Str. cremoris*	*Th. bulgaricum*	*Streptobact. casei*	*Str. agalactiae I*	*Str. agalactiae H*	Zakwas edamski Edam cheese leaven	Zakwas maślarski Butter leaven
Podłoże nie rozcieńczone Undiluted medium	27,5	22,5	22,0	19,5	19,0	17,0	16,0	16,0	23,5	14,0
Podłoże rozcieńczone 1 : 2 Medium diluted 1 : 2	26,5	20,0	20,5	18,0	18,0	16,0	15,5	15,5	21,5	13,5

Wrażliwość bakterii kwasu masłowego na działanie antybiotyku wytwarzanego przez szczep *91* oznaczano na kilku szczepach izolowanych z próbek sera wzdętego. Żaden z tych szczepów nie posiadał cech charakterystycznych dla *Cl. tyrobutyricum*, niektóre podstawowe właściwości były jednak zbieżne; szczepy te nie upłynniały żelatyny, nie fermentowały mannitolu, fermentowały natomiast mleczany, wytwarzając duże ilości gazu. Fermentowały także laktozę. Tylko dwa szczepy wytwarzały przetrwalniki.

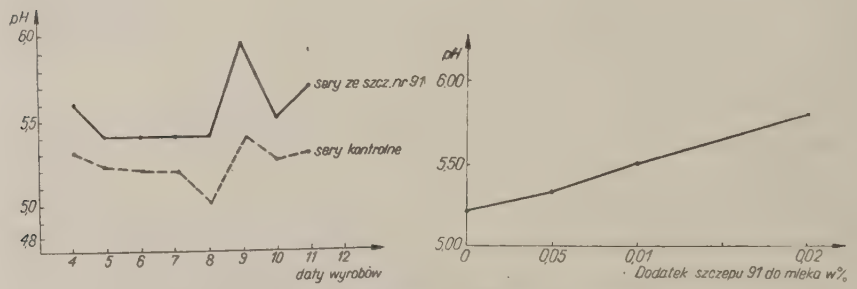
Wrażliwość badanych szczepów na działanie antybiotyku nie była jednakowa. W obrębie tego samego szczepu największą odporność wykazywały formy przetrwalnikujące, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych w doświadczeniach tego samego typu przez Hirscha i Grinsted (1954). Mieszanina form wegetatywnych i przetrwalników była znacznie mniej wrażliwa na działanie antybiotyku niż same formy wegetatywne. Działalność bakteriobójcza antybiotyku wzrastała wraz ze zmniejszeniem się ilości komórek bakteryjnych. W rozcieńczeniach antybiotyku mniejszych od tych, które działały bakteriobójczo, wykazywał on działanie bakteriostatyczne.

Wyniki uzyskane w opisanych doświadczeniach laboratoryjnych pozwoliły przewidywać, że w warunkach normalnej produkcji sera szczep *91* będzie mógł przeciwdziałać występowaniu fermentacji masłowej w serach.

Pierwszą serię doświadczeń na skalę technologiczną przeprowadzono jesienią 1954 roku w serowni produkującej sery typu edamskiego z mleka pasteryzowanego. Zakład ten produkował sery stosunkowo niskiej jakości. W niektórych porach roku wykazywały one objawy fermentacji masłowej. Mleko przeznaczone na wyrób serów zakażano określonymi ilościami 3- do 4-tygodniowych hodowli bakterii kwasu masłowego, uzyskując w ten sposób od 300 do 1200 komórek bakterii kwasu masłowego w 1 ml mleka. Mleko dzielono na 4 partie, do dwóch dodawano 24-godzinne hodowle szczepu *91* w mleku pełnym sterylizowanym w ilości stanowiącej 50% ilości dodawanego normalnie zakwasu serowarskiego. Dalszy wyrób sera przeprowadzano normalnie.

Działalność szczepu *91* w wyprodukowanych serach stwierdzono przez oznaczanie *pH* 24-godzinnych serów. Sery wyprodukowane z mleka, do którego dodano szczep wytwarzający antybiotyk, wykazywały zahamowanie procesów fermentacyjnych; ich *pH* było wyższe niż równoległych serów kontrolnych.

Wpływ dodatku szczepu *91* na *pH* 24-godzinnych serów przedstawiają rysunki **1 i 2.**



Rys. 1. Wpływ szczepu *91* na *pH* serów

Rys. 2. Zależność *pH* sera od ilości wsianego szczepu *91* po 24-godzinnym dojrzewaniu

Fig. 1. The effect of *Sreptococcus* No *91* on *pH* of chees

Fig. 2. Correlation between *pH* of chees and the inoculum of *Streptococcus* No *91*

Po pięciu tygodniach dojrzewania poddano sery ocenie organoleptycznej. Ocena wykazała wyraźnie hamujące działanie antybiotyku wytwarzanego przez szczep 91 w stosunku do bakterii kwasu masłowego. Sery doświadczalne nie wykazywały objawów fermentacji masłowej, występowała ona natomiast w równoległych serach kontrolnych. Typowymi przykładami są załączone fotografie (Fot. 4, Tabl. VIII — po str. 272).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przeprowadzone doświadczenia, mimo że nie miały na celu charakterystyki substancji antybiotycznej wytwarzanej przez szczep *91*, pozwoliły stwierdzić, że antybiotyk ten jest odporny na działanie temperatury 100° w ciągu 5 minut w środowisku, którego *pH* jest niższe od 7. Pod tym

względem jest podobny do nizyny. Natomiast stosunkowo słabe działanie na badane szczepy *Str. agalactiae* i *Str. cremoris* różni go od nizyny.

Wyniki doświadczeń nad wpływem temperatur, zbliżonych do stosowanych przy wyrobie serów wysoko dogrzewanych, na zdolność wytwarzania antybiotyku, nad wrażliwością szczepów bakterii fermentacji mlekowej, nad wrażliwością kilku szczepów bakterii kwasu masłowego pozwalały przypuszczać, że w warunkach produkcji sera antybiotyk ten zahamuje rozwój tych ostatnich.

Wyniki prób technologicznych wyrobu sera edamskiego wykazały celowość zastosowania w produkcji przemysłowej sera edamskiego dodatku szczepu *91* do mleka, przeznaczonego do wyrobu sera, w ilości stanowiącej 50% dodawanego normalnie zakwasu serowarskiego.

Chociaż żaden ze szczepów bakterii kwasu masłowego użyty do doświadczeń technologicznych nie miał wszystkich cech przypisywanych *Cl. tyrobutyricum*, wszystkie sery kontrolne wyprodukowane z mleka zakażonego tymi szczepami wykazywały typowe objawy fermentacji masłowej. Nasuwa się więc wniosek, że fermentację masłową w serze wywołują, poza *Cl. tyrobutyricum*, także inne gatunki bakterii kwasu masłowego.

LITERATURA

1. Van Beynum J. u. Pette J. W., 1935 - 6: *Zentr. Bakter., II,* **93**:198.
2. Clintock Mc M., Serres L., Mazolf I. Hirsch A., Mocquot G., 1952: *J. Dairy Res.*, **19**:187.
3. Dorner W., Demont P., Chavanes D., 1942: Microbiologie laitiarie. Lausanne.
4. Hirsch A., 1951: *J. gen. Microbiol.*, **5**:208.
5. Hirsch A., Grinsted E., Chapman H. R. a. Mattick A. T. R., 1951: *J. Dairy Res.*, **18**:205.
6. Hirsch A. a. Grinsted E., 1954: *J. Dairy Res.*, **21**:101.
7. Mattick A. T. R. a. Hirsch A., 1947, *Lancet*, 5.
8. Oxford A. E., 1944, *Bioch. J.*, **38**:178.
9. Pette J. W. a. Koody J. S., 1953: XIII Międz. Kongres Mlecz., **4**:3.16.1172.

E. Lipińska

MICROBIOLOGICAL METHODS OF CONTROL OF THE BUTYRIC ACID FERMENTATION IN CHEES

Summary

Four strains of streptococci producing relatively large amounts of antibiotic substances, the physiological properties of which allowed them to be classified to serological group N, were isolated from samples of cows' and sheeps' milk.

By using one of these strains the antibiotic content was determined in the whey separated from fermented milk: after various times of incubation, after subjecting the inoculated milk to the action of temperatures used in the production of Emmenthaler and Groyer type cheeses.

The sensitiveness to the action of antibiotics produced by strain No *91* of several bacterial strains, typical as components of lactic fermentation leaven, butter leaven and Edam cheese leaven, was determined, as also of two strains of *Streptococcus agalactiae* and of several butyric acid bacteria strains isolated from samples of swollen cheeses.

Experiments were conducted on a technological production scale of Edam type cheese made from pasteurized milk inoculated with butyric acid bacteria and using as leavens antibiotic strain No. *91* and butter leaven.

The results obtained showed the effective inhibition of butyric fermentation in Edam type cheeses by antibiotic strains added to the milk in vats.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 277—284

R. Kowalik i *I. Sadurska*

MIKROFLORA NISZCZĄCA PAPIER, SKÓRĘ I PIECZĘCIE WOSKOWE, WYSTĘPUJĄCA W POWIETRZU MAGAZYNÓW ARCHIWALNYCH

Z Laboratorium Mikrobiologicznego Instytutu Barwników i Półproduktów w Warszawie

Powietrze może stać się, zwłaszcza w okresie jesiennym (opadanie liści i gnicie resztek roślinnych), jednym z powodów niszczenia papieru, skóry i pieczęci woskowych.

Oznaczenie zawartości mikroorganizmów w powietrzu bibliotek włoskich badała Camposano (1950) na podłożach: agar z fasolą i bulion z agarem.

W naszej pracy użyliśmy szeregu podłóż celulozowych, podanych przez Kowalika (1952) oraz podłóż z woskiem (Bushnell, Haas 1941) i podłóż do hodowli mikroorganizmów pochodzących ze skóry oprawowej (Czapek-Doxa i agar z wodą), aby zebrać te mikroorganizmy, które zagrażają zbiorom archiwalnym, bibliotecznym i muzealnym.

PRACE WŁASNE

Doświadczenia przeprowadzono w magazynach Archiwum Głównego Akt Dawnych w Pałacu pod Blachą i w Wilanowie w czerwcu i listopadzie w latach 1953 i 1954. Hodowle nastawiano na płytkach Petriego w sposób nieco odbiegający od przepisu Omelianskiego (1953). Płytki otwierano powolnym ruchem ręki, aby nie wywołać ruchu powietrza. Ramię wysuwano możliwie najdalej, aby nie zanieczyścić powietrza mikroorganizmami, które znajdują się na ciele lub odzieży. Rękawy fartucha zawijano i dezynfekowano ręce. Górną część płytki zdejmowano po uspokojeniu się ruchu powietrza. Płytki trzymano otwarte w ciągu 2 godzin, ponieważ magazyny archiwalne są dość rzadko uczęszczane, a więc zawierają mniej pyłu, niż inne pomieszczenia, np. czytelnie, gdzie płytki winno się otwierać na 1 godzinę lub krócej. Płytki przewożono do laboratorium i trzymano przez 6 tygodni w temperaturze pokojowej. Po 5 dniach, a następnie co 48 godzin sprawdzano powstałe kolonie i niektóre z nich izolowano. Przy sprawdzaniu zwracano uwagę na jakość a nie na ilość powstałych kolonii.

Najczęściej występującymi mikroorganizmami na bibule do sączenia lub podłożach agarowych celulozowych były kolejno: *Cladosporium*, promieniowce, *Alternaria, Penicillium*, bakterie przeważnie żółto zabarwione, *Botrytis, Aspergillus, Stemphylium, Phoma, Coprinus*. Rzadziej występowały: *Trichoderma, Fusarium, Rhizoctonia, Cephalosporium, Stysanus, Chaetomium, Epicoccum, Humicola, Torula, Sepedonium, Verticillium, Paecilomyces, Stachybotrys, Thielavia, Pellicularia*. Dwa razy wystąpiły: *Pullularia, Sporotrichum* i *Papulosa*. Tylko raz wystąpiły: *Curvularia, Acrothecium, Trichothecium, Chloridium, Scopulariopsis, Gliomastix, Trichocladium, Helminthosporium* (Tabela I).

Tabela I

Mikroflora niszcząca papier, występująca w powietrzu magazynów archiwalnych
Microorganisms able to destroy paper isolated from the air of archives

Rodzaje mikroorganizmów Microorganisms	Ilość mikroorganizmów w % ogólnej ilości Per cent of total number of microorganisms collected							Ogólna ilość mikroorganizmów w latach 1953 i 1954 Number of microorganisms 1953 a. 1954
	1953 rok ogólna ilość 170 Number of microorganisms collected-170		1954 rok ogólna ilość 335 Number of microorganisms collected-335		1953 i 1954 rok ogólna ilość 505 Number of microorganisms collected-505			
	wiosna spring	jesień autumn	wiosna spring	jesień autumn	wiosna spring	jesień autumn	wiosna i jesień spring and autumn	
Acrothecium	—	—	0,3	—	0,2	—	0,2	1
Alternaria	7,5	7	7,2	2,4	7,3	4	11,3	57
Aspergillus	6,4	—	3,6	2	4,6	1,4	6	30
Botrytis	2,2	6,3	3	2	2,8	3,5	6,3	32
Cephalosporium	1,2	—	0,9	0,6	0,9	0,4	1,3	7
Chaetomium	1,2	0,6	0,6	0,3	0,8	0,4	1,2	6
Chloridium	—	—	0,3	—	0,2	—	0,2	1
Cladosporium	8,9	4,8	7,5	9,9	8	8,1	16,1	81
Coprinus	1,2	1,7	1,5	0,6	1,4	0,9	2,3	12
Curvularia	0,6	—	—	—	0,2	—	0,2	1
Epicoccum	0,6	0,6	0,9	0,3	0,8	0,4	1,2	6
Fusarium	—	0,6	1,8	0,9	1,2	0,8	2	10
Gliomastix	—	—	—	0,3	—	0,2	0,2	1
Helminthosporium	—	—	—	0,3	—	0,2	0,2	1
Humicola	0,6	—	0,3	1,2	0,4	0,8	1,2	6
Papulosa	—	—	—	0,6	—	0,4	0,4	2
Paecilomyces	0,6	—	0,3	0,3	0,4	0,2	0,6	3
Pellicularia	—	—	0,6	0,3	0,4	0,2	0,6	3
Penicillium	6	1,7	2,7	5,4	3,7	4,2	7,9	40
Pestalozzia	—	—	—	—	—	—	—	—
Phoma	1,2	1,2	3,0	1,5	2,3	1,4	3,7	19
Pullularia	0,6	0,6	—	—	0,2	0,2	0,4	2
Rhizoctonia	—	—	1,8	0,6	1,2	0,4	1,6	8
Sepedonium	1,2	0,6	—	0,6	0,4	0,6	1,0	5
Scopulariopsis	—	—	0,3	—	0,2	—	0,2	1
Sporotrichum	—	—	0,6	—	0,4	—	0,4	2
Stachybotrys	1,2	—	0,3	—	0,6	—	0,6	3
Stemphylium	4,0	3,0	3,0	0,9	3,4	1,6	5,0	25
Stysanus	1,2	0,6	0,6	0,3	0,8	0,4	1,2	6
Thielavia	—	—	0,3	0,6	0,2	0,4	0,6	3
Torula	2,2	0,6	—	—	0,8	0,2	1,0	5
Trichocladium	—	—	—	0,3	—	0,2	0,2	1
Trichoderma	1,2	1,2	1,5	0,3	1,4	0,6	2,0	10
Trichothecium	—	—	0,3	—	0,2	—	0,2	1
Verticillium	0,6	—	0,3	0,6	0,4	0,4	0,8	4
Actinomycetes	6,0	4,8	6,2	9,1	6,1	7,7	13,8	70
Bakterie (bacteria)	3,5	3,0	5,1	1,8	4,6	2,1	6,7	34
Niezidentyfikow. not identified	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1,2	6

Na wiosnę wystąpiło więcej gatunków rodzaju: *Phoma, Aspergillus, Alternaria, Stemphylium,* bakterie oraz *Curvularia, Acrothecium, Trichothecium, Sporotrichum, Chloridium, Scopulariopsis, Stachybotrys,* których nie obserwowano na jesieni.

W jesieni w ciągu obu lat wystąpiło więcej gatunków rodzaju: *Penicillium* i *Streptomyces* oraz: *Gliomastix, Trichocladium, Helminthosporium, Papulosa,* które nie wystąpiły na wiosnę.

Z wyizolowanych szczepów przebadano i określono 13 nie opisanych w naszych poprzednich pracach.

Obserwację stadiów wzrostowych czystych szczepów przeprowadzono na kwadracikach celofanowych (Krzemieniewska, 1930), na podłożu odpowiednim dla danego organizmu i wykonano zdjęcia mikroskopowe przy pomocy aparatu Kino-Exacta. Przeprowadzono również badania biochemiczne, sprawdzając zdolność wykorzystania różnych źródeł azotu przy różnym *pH* oraz źródeł węgla przy najlepszym źródle azotu i *pH*, określając przy tym optymalne stężenie cukrów i alkoholi (jak w pracy Czerwińskiej i Kowalika, 1956). Własności proteolityczne sprawdzono tylko na żelatynie.

Gatunek *Pellicularia isabellina* (Bessey, 1952; Saccardo, 1944; Viennot-Bourgin, 1949) daje na podłożach płynnych z bibułą do sączenia cienką błonę grzybni o szerokich komórkach barwy jasnobrązowej. Najlepszym źródłem azotu dla tego gatunku był azotan sodu przy *pH* 5, pozostałe źródła azotu są dobrze wykorzystywane, ale przy wyższym *pH*, *Pellicularia* nie hydrolizuje żelatyny (Fot. 1, Tabl. IX — po str. 280).

Coprinus sclerotinogenus (Saccardo, 1944) na papierze tworzy grzybnię początkowo białą, następnie brązową, i wypukłe skleroty, które w pierwszych dniach hodowli zabarwione są na biało, potem stopniowo przybierają barwę czarną. Po pewnym czasie grzyb ten wydziela na powierzchni sklerotów liczne bezbarwne perełki płynu. Gatunek ten został już poprzednio wyodrębniony z papierów archiwalnych i dawał owocniki w postaci kapelusza. Podobnie owocował w probówce z bibułą do sączenia i podłożem płynnym Greathouse. Później dobrze owocował również na płytce Petriego z podłożem ziemniaczanym i krążkiem bibuły, nasyconym żywicą mocznikowo-formaldehydową. Do jego metabolizmu potrzebny jest przypuszczalnie azot w postaci jonu NH_4. Wszystkie źródła węgla są dobrze wykorzystywane przy stężeniu 1%. Najlepiej wykorzystywana była glikoza, najsłabiej arabinoza. Żelatyny nie hydrolizuje.

Sporotrichum przyp. *bombycinum* (Saccardo, 1944; Thaysen, Bunker, 1927). Gatunek ten według Van Itersona (1904) posiada słabe własności rozkładu błonnika i rośnie na bibule do sączenia w postaci białej, matowej podobnej do wełny grzybni. Najlepszym źródłem azotu dla tego grzyba jest siarczan amonu. Pozostałe źródła azotu dobrze wykorzystuje. Dobry wzrost na wszystkich źródłach węgla, najsłabiej wykorzystuje arabinozę. Hydrolizuje żelatynę.

Botrytis cinerea (Saccardo 1944, Thaysen, Bunker 1927) rośnie na papierze w postaci delikatnych kolonii z silnie rozwiniętą grzybnią powietrzną, lekko zabarwioną na kolor brudnobrązowy. Po kilkunastu dniach hodowli na papierze daje typowe skleroty, barwy jasnej, które szybko zwiększają swoją objętość i zmieniają barwę na brudnozieloną, wreszcie czarną. W późniejszym stadium skleroty osiągają

średnicę kilku mm. Najlepszym źródłem azotu dla *Botrytis* jest siarczan amonu, zwłaszcza przy wyższym *pH*, wzrost jednak następuje nawet przy *pH* 3. Ze źródeł węgla dobrze wykorzystuje w stężeniach 1 i 0,5-procentowych sacharozę, mannozę, maltozę, glikozę, galaktozę, ksylozę i glicerol, przy niższych stężeniach glicerolu brak wzrostu. Pozostałe źródła słabo wykorzystywane przy braku owocowania. Żelatyny nie hydrolizuje (Fot. 2, Tabl. IX).

Chloridium minutum (Mangenot 1953, Saccardo 1944). Rośnie na bibule w postaci delikatnego szarego proszku. Z przebadanych źródeł azotu najlepiej wykorzystuje asparaginę, pozostałe bardzo słabo. Wszystkie źródła węgla w wyższych stężeniach dobrze wykorzystywane. Hydrolizuje żelatynę.

Helminthosporium sp. (Smith 1947, Viennot-Bourgin 1949) daje na papierze na ogół szare plamy i strzępki powietrzne tej samej barwy. Podczas owocowania powstaje ciemne zabarwienie. U nas rósł najlepiej na celulozie regenerowanej (celofanie), gdzie też dobrze owocował. Najlepiej wykorzystywał siarczan amonu, ze źródeł węgla najsłabiej wykorzystywał arabinozę. Żelatynę hydrolizuje słabo z wydzieleniem barwnika do podłoża (Fot. 3, Tabl. IX).

Curvularia z grupy *geniculata*, przyp. *uncinata* (Subramanian 1953, Viennot-Bourgin 1949). Na papierze gatunek ten daje czarne kropki, po czym dużą plamę. Silnie niszczy papier. Najlepszym źródłem azotu dla tego gatunku jest fosforan amonu. Najbardziej odpowiednim źródłem węgla jest galaktoza w stężeniu 0,1% i mannitol w stężeniu 0,5%. Bardzo słabo wykorzystuje (brak owocowania, wzrost bardzo słaby lub brak) sacharozę, mannozę, maltozę, glikozę i dulcytol. Żelatyny nie hydrolizuje (Fot. 4, Tabl. IX).

Trichothecium roseum (Smith 1947, Viennot-Bourgin 1949) daje na papierze wzrost kłaczkowaty, silnie rosnący, początkowo biały, potem stopniowo nabierający barwy bladoróżowej. Najlepszym źródłem azotu dla tego gatunku jest fosforan amonu. Najbardziej odpowiednim źródłem węgla jest sacharoza w stężeniu 1%, pozostałe źródła węgla są dobrze wykorzystywane w stężeniach 0,5%. Żelatynę szybko hydrolizuje (Fot. 5, Tabl. IX).

Acrothecium sp. (Viennot-Bourgin 1949) silnie rozkłada papier, barwiąc go na kolor oliwkowozielony. Najlepszym źródłem azotu dla tego grzyba jest mocznik, z nieorganicznych natomiast siarczan amonu. Ze źródeł węgla dobrze wykorzystywane są, szczególnie przy wyższych stężeniach: galaktoza, mannoza, sacharoza, maltoza i glikoza. Pozostałe słabo wykorzystywane. Żelatynę hydrolizuje słabo z wydzieleniem barwnika do podłoża (Fot. 6, Tabl. IX).

Tablica IX

Do pracy: Kowalik i Sadurska, str. 277.

Fot. 1. *Pellicularia isabellina*
Fot. 2. *Botrytis cinerea*
Fot. 3. *Helminthosporium sp.*
Fot. 4. *Curvularia* z gr. *geniculata*, przyp. *mucinata*
Fot. 5. *Trichothecium roseum*
Fot. 6. *Acrothecium sp.*
Fot. 7. *Fusarium scirpi*
Fot. 8. *Pestalozzia sp.*

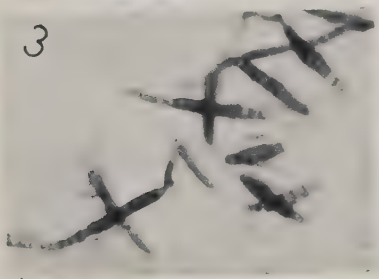
(Fot. 1, 3-8 pow. 250 x; fot. 2 — pow. 420 x)

Table IX

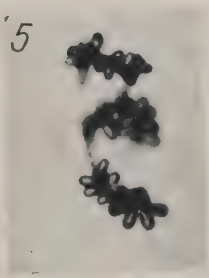
To the paper by Kowalik and Sadurska, p. 277.

1

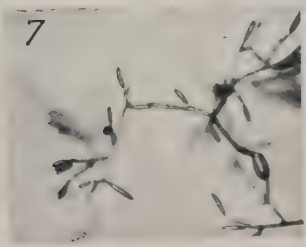
2

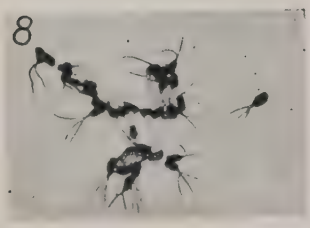

3

4


5

6


7


8

Tablica X

Fot. 1. Działanie p-nitrofenolu na *Aspergillus niger* (hodowla na agarze): a) stężenie 0,001%, b) stężenie 0,01%, c) stężenie 0,03%.

Działanie p-nitrofenolu bezpośrednio na skórze:

Fot. 2. *a* — kontrola, *b* — stężenie 0,03%, *c* — stężenie 0,1%.

Fot. 3. *a* — kontrola, *b* — lakier etylocelulozowy, *c* — lakier etylocelulozowy — 0,25% p-nitrofenolu.

Fot. 4. *a* — kontrola, *b* — środek natłuszczający, *c* — środek natłuszczający — 0,25% p-nitrofenolu.

(Pożywka Czapek-Doxa)

Table X

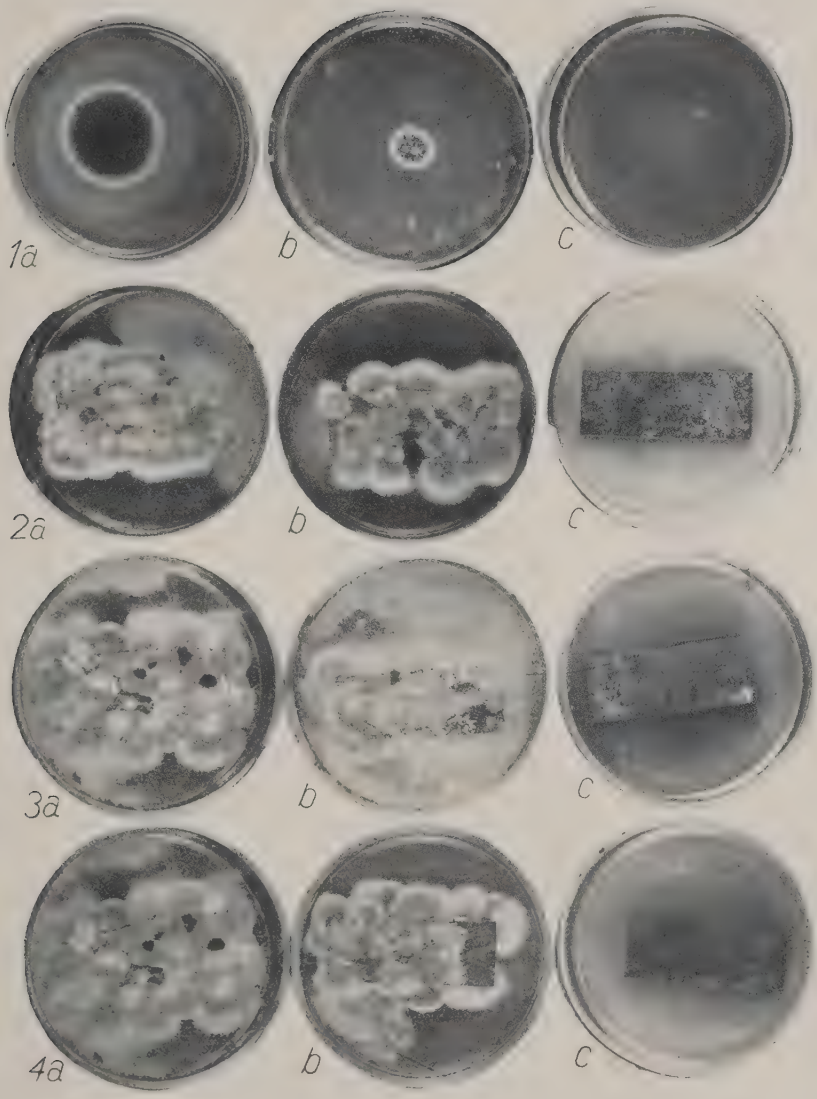
Phot. 1. The effect of p-nitrophenol on *Aspergillus niger*. *a* — concentration 0,001%, *b* — conc. 0,01%, *c* — conc. 0,03%.

The effect of p-nitrophenol applied directly on leather:

Phot. 2. *a* — control, *b* — concentration 0,03%, *c* — conc. 0,1%.

Phot. 3. *a* — control, *b* — ethylcellulosic lacquer, *c* — ethycellulosic lacquer — 0,25% p-nitrophenol.

Phot. 4. *a* — control, *b* — lanoline mixture, *c* — lanoline mixture — 0,25% p-nitrophenol.


1a
b
c
2a
b
c
3a
b
c
4a
b
c

Z 10 wyodrębnionych przez nas dokładniej sprawdzono 3 gatunki rodzaju *Fusarium*. Przypominają one według Raillo (1950) i Moroczkowskiego (1948) *Fus. oxysporum, orthoceras* i *scirpi*.

Fusarium oxysporum dobrze wykorzystuje wszystkie badane źródła azotu, najlepiej siarczan amonu. Na podłożu z fosforanem następuje zmiana barwy w zależności od *pH*. Przy niskim *pH* barwa intensywnie fioletowa, przy wysokim niebieska. Żelatynę szybko rozpuszcza z wydzieleniem barwnika.

Fusarium orthoceras dobrze wykorzystuje mocznik, siarczan i fosforan amonu. Na siarczanie i fosforanie amonu następuje zmiana barwy w zależności od *pH* (od fioletowej do żółtej). Wszystkie źródła węgla przy wyższych stężeniach są dobrze wykorzystywane. Najlepszym źródłem węgla jest sacharoza, najgorszym arabinoza. Żelatynę hydrolizuje. Gatunek ten po zadziałaniu tlenkiem etylenu i przeszczepieniu na agar ziemniaczany tworzył chlamydospory.

Fusarium scirpi. Najlepszym źródłem azotu dla tego gatunku jest mocznik, z nieorganicznych fosforan i siarczan amonu. Na fosforanie, siarczanie i azotanie amonu tworzą się sporodochia. Na siarczanie w zależności od *pH* następuje zmiana barwy podłoża od bezbarwnej przy *pH* 3, poprzez żółtą do różowej przy *pH* 8. Wszystkie źródła węgla są dobrze wykorzystywane, a przy stężeniu 0,5% tworzą się sporodochia. Najlepszym źródłem węgla jest dulcytol, najgorszym arabinoza. Hydrolizuje żelatynę (Fot. 7, Tabl. IX).

Rhizoctonia solani (Bessey 1952, Viennot-Bourgin 1949) daje cienką błonę grzybni na papierze i po pewnym czasie tworzy brązowe skleroty, silnie przylegające do podłoża. Najlepiej wykorzystuje azotan sodu przy *pH* 6, siarczan amonu przy *pH* 8 i fosforan amonu przy *pH* 5. Pozostałe źródła azotu wykorzystuje bardzo słabo. Szybko hydrolizuje żelatynę z wydzieleniem barwnika do podłoża.

Pestalozzia sp. (Guba 1929, Shen 1932). Szczep ten wyizolowaliśmy z papieru pochodzącego z XVIII wieku. W powietrzu nie wystąpił, podajemy go jednak tutaj, ponieważ nie opisaliśmy go w dotychczasowych pracach. Na papierze daje czarne plamy z jasnoróżową strefą dokoła. Czarne plamy na papierze powstają od tworzących się *acervuli*. Gatunek ten dość silnie niszczy papier. Najlepszym źródłem azotu dla tego grzyba jest azotan sodu. Ze źródeł węgla najlepiej wykorzystuje mannitol, najsłabiej arabinozę (Fot. 8, Tabl. IX).

Na podłożach z woskiem wystąpiły przede wszystkim: *Penicillium, Asperaillus* i promieniowce oraz *Cephalosporium, Fusarium, Stemphylium* i *Cladosporium*, których nie wymieniono w literaturze jako grzyby niszczące wosk (Niethammer 1947).

Na podłożu Czapek-Doxa i agarze z wodą z paskami skóry wystąpiły: *Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Epicoccum* i *Scopulariopsis brevicaulis var. glabra.*

Ze względu na przeprowadzaną dezynsekcję materiałów archiwalnych za pomocą mieszaniny tlenku etylenu i dwutlenku węgla (10 : 90) w komorze próżniowej zainstalowanej w A.G.A.D. w Warszawie, uważano za wskazane zbadanie wpływu tego gazu na omawiane szczepy. Tlenek etylenu działał zabójczo na wszystkie szczepy z wyjątkiem *Fusarium orthoceras.*

Należy zaznaczyć, że Frobisher (cyt. wg Kirk, Othmer 1954) wskazuje na możliwość jałowienia materiałów, wrażliwych na ciepłotę lub ciśnienie pary, w autoklawach dostosowanych do użycia tlenku etylenu zamiast pary wodnej.

Sprawdzono również rozpuszczalność barwników opisanych grzybów w alkoholu, eterze i benzenie, używanych jako rozpuszczalniki środków grzybobójczych przy dezynfekcji akt. Tylko barwniki 2 grzybów: *Trichothecium roseum* i *Acrothecium sp.* rozpuszczały się, pierwszy w alkoholu, drugi w benzenie i eterze.

Przeprowadzono również badania wpływu promieni ultrafioletowych na opisane szczepy. Kilku autorów (Biełaja 1954, Latarjeti współpr. 1953, Monacci 1952) poleca ultrafioletowe lampy bakteriobójcze do odkażania powietrza w szpitalach, magazynach żywnościowych oraz bibliotekach. W naszych próbach naświetlania zarodników grzybów lampami UV Astralux o długości fali 2536 Å, wysokopróżniowych, rtęciowych, nieozonizujących, w czasie 30 i 60 minut dały ujemne wyniki. Wszystkie użyte do doświadczeń szczepy po przeszczepieniu na podłoże agarowe dawały wzrost taki sam jak na płytkach kontrolnych.

ZAKOŃCZENIE

Najczęściej występującymi mikroorganizmami w powietrzu magazynów archiwalnych są kolejno: *Cladosporium*, promieniowce, *Alternaria*, *Penicillium* oraz żółto zabarwione bakterie. Jest rzeczą interesującą, że często spotykany na papierach archiwalnych *Stachybotrys* rzadko występował w powietrzu. Możliwe, że pleśń ta dostaje się do papieru podczas jego produkcji z tkanin lub drewna. Warto również zaznaczyć, że częściej występujące grzyby, jak *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* mogą wywoływać choroby u ludzi i zwierząt (Bravi 1943, Gallo 1953, Martin-Scott 1954, Sax 1951). Według nowszych badań *Alternaria* przypuszczalnie powoduje astmę, *Aspergillus fumigatus* mykozę płuc, *Cladosporium* schorzenia skóry i dróg oddechowych, a *Penicillium* i *Alternaria* mogą powodować stany alergiczne dróg oddechowych. Rzadziej występujący *Scopulariopsis* wywołuje choroby skóry i grzybicę paznokci. A więc ze względu na szkodliwe działanie grzybów na zbiory archiwalne, muzealne i biblioteczne oraz na szkodliwe działanie na człowieka, dezynfekcja pomieszczeń archiwalnych jest bardzo ważnym zagadnieniem. Proponowane do dezynfekcji pomieszczeń bibliotecznych przez Biełą (1954) lampy bakteriobójcze ultrafioletowe w naszych doświadczeniach na pleśniach okazały się nieskuteczne.

Dalszych prób nie przeprowadzano. Wydaje nam się, że promienie ultrafioletowe będą mało skuteczne zwłaszcza w stosunku do często występujących grzybów z zarodnikami o ciemnych błonach, jak *Cladosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium*. Poza tym obawiamy się wprowadzenia lamp bakteriobójczych ultrafioletowych do dezynfekcji pomieszczeń archiwalnych z uwagi na szkodliwy wpływ promieni ultrafioletowych na papier.

Należałoby raczej przeprowadzić próby z aerosolami glikolu propylenowego i trójetylenowego w połączeniu z alkoholem i wodą, lub w postaci par. Frobisher (Kirk, Othmer 1954) podaje, że glikol trójetylenowy jest szczególnie skuteczny.

LITERATURA

1. Bessey E. A., 1952, Morphology and taxonomy of fungi. Constable and Co. Ltd. London.
2. Biełaja I., 1954: Baktericidnaja łampa w bibliotekie. *Bibliotekar*, **1**:44.
3. Bravi L., 1943: Disinfezione dei libri e igiene bibliotecaria. Gubbio. Tipografia Eugubina.
4. Bushnell L. D. Haas H. F., 1941: *J. Bact.*, **41**:653.
5. Composano A., 1950: Sul contenuto microbico dell aria in ambienti destinati alla conservazione e al restauro di materiale bibliografico. *Boll. del Istit. di Patol. del libro*, **9**:35.
6. Gallo P., 1953: Considerazioni sui rapporti tra i funghi ospiti della carta e le micosi umane. *Boll. del Istit. di Patol. del libro*, **12**:78.
7. Guba E. F., 1929: Monograph of the genus Pestalotia de Notaris. *Phytopathol.*, **19**: 91.
8. Kirk R. E., Othmer D. F., 1954: Encyclopedia of chemical technology. New-York, Interscience Encyclopedia.
9. Kowalik R., 1952: Mikroorganizmy niszczące papier zabytkowy. *Prace Placówek Nauk.-Bad. Min. Przem. Chem.* **2**.
10. Krzemieniewska H., 1930: Le cycle evolutif de *Spirochaeta cytophaga* Hutchinson et Clayton. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **7**:507.
11. Latarjet R., Morenne P., Berger R., 1953: Un appareil simple pour le dosage des rayonnements ultraviolets emis par les lampes germicides. *Ann. Pasteur*, **85**:174.
12. Martin-Scott J., 1954: Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis*. *Brit. Mycol. Soc. Trans.*, **37**:38.
13. Mangenot F., 1953: Sur quelques Hyphales Dematiées Lignicoles. *Revue Mycol.*, **18**:133.
14. Monacci V., 1952: Ricerche sulla disinfezione dell aria con iraggi ultravioletti. *Boll. Ist. Sieroterap. Milano*, **131**:301.
15. Moroczkowski S. F., 1948: Gribnaja flora kagatnoj gnili sacharnoj swiekły. Moskwa. Piszczepromizdat.
16. Niethammer A., 1947: Technische Mykologie. Stuttgart. Ferd. Enke.
17. Omeliański W. Ł., 1953: Izbrannyje trudy. Moskwa. Izdat. Akad. Nauk.
18. Raillo A. J., 1950: Griby roda *Fusarium*. Moskwa. Gosud. Izd. Siel. Liter.
19. Saccardo P. A., 1944 (1882): *Sylloge fungorum* (Przedruk) Michigan.
20. Sax I., 1951: Dangerous materials. New-York. Reinhold Publ. Corp.
21. Shen C. J., 1932: Species of *Pestalozzia* and *Monochaetia* in China. *Contrib. Biol. Labor. Sci Society of China, Bot. Ser.*:131.
22. Smith G., 1947: An introduction to industrial mycology. Arnold and Co. London.
23. Subramanian C. V., 1953: *Fungi imperfecti* from Madras. *V. Curvularia*. *Proc. Ind. Acad. Sci.*, **38**:27.
24. Thaysen A. C., Bunker H. J., 1927: The microbiology of cellulose, hemicelluloses, pectin and gums. Oxford University Press.
25. Van Iterson C., 1904: Die Zersetzung von Cellulose durch aerobe Mikroorganismen. *Zentr. Bakter. II*, **11**:689.
26. Viennot-Bourgin G., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris. Masson et C-ie.

R. Kowalik and *I. Sadurska*

MICROORGANISMS DESTROYING PAPER, LEATHER AND WAX SEALS IN THE AIR OF ARCHIVES

Summary

The studies were performed in june and november of 1953 and 1954. On 19 cellulose media the most often observed were following microorganisms: *Cladosporium, Actinomycetes, Alternaria,* few members of a genus *Penicillium* and yellow bacteria not identified.

On Czapek-Dox medium with leather and agar with water appeared: some strains of a genus *Penicillium* and *Aspergillus, Alternaria, Cladosporium, Epicoccum,* and *Scopulariopsis brevicaulis var. glabra.*

On a wax medium the growth of some strains of *Penicillium, Aspergillus, Actinomycetes, Cephalosporium, Fusarium, Stemphylium* and *Cladosporium* was noted.

There is given a description of physiological, morphological and biochemical characteristics of: *Pellicularia isabellina, Coprinus sclerotinogenus, Sporotrichum* propably *bombycinum, Botrytis cinerea, Chloridium minutum, Helminthosporium sp., Curvularia* from group *geniculata* probably *uncinata, Trichothecium roseum, Acrothecium sp., Fusarium scirpi, Fus. oxysporum, Fus. orthoceras, Rhizoctonia solani. Pestalozzia sp.* isolated from a paper (from XVIII century) was also described.

Ethylene oxide and carbon dioxide (10 : 90) in a vacuum chamber was shown to be fungicidal for all strains tested with exception of *Fusarium orthoceras.*

The trials were carried to control the fungi with the UV radiations (wave length 2536 Å, exposure — 30 and 60 minutes) but without effect.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 285—290

R. Kowalik i *I. Sadurska*

MIKROORGANIZMY NISZCZĄCE OPRAWY KSIĄŻKOWE ZE SKÓRY

Z Laboratorium Mikrobiologicznego Instytutu Barwników i Półproduktów w Warszawie

Skóra i pergamin są bardziej odporne na działanie czasu od papieru zabytkowego. Produkty te jednak ulegają twardnieniu, zmiękczeniu, rozkładowi, połamaniu, splamieniu, zmianie barwy i rozsypywaniu się. Zniszczenia te częściowo można przypisać czynnikom fizycznym (np. temperaturze), chemicznym (działaniu dwutlenku siarki), a częściowo biologicznym (działaniu owadów i mikroorganizmów).

Wrażliwość skóry oprawowej na atak mikroorganizmów zależy od typu skóry, typu barwnika, metod introligatorskich, głównie jednak od metod garbowania. Skóry używane na oprawy z uwagi na fizyczne własności garbuje się garbnikami roślinnymi, wrażliwymi na mikroflorę. Poza tym płyny używane do garbowania zawierają niegarbniki (w ilości 2 - 28%), np. cukry, kwas galasowy, inne hydrokwasy, hemicelulozy i związki polimocznikowe, które wpływają również pobudzająco na pleśnienie (Woodroffe 1948).

Substancja właściwa skóry — kollagen, białko o ciężarze cząsteczkowym 55 000 (Wiederhorn, Reardon 1952) należy do bardzo odpornych produktów i nie ulega atakowi mikroorganizmów, z wyjątkiem rozkładu w warunkach anaerobowych przez *Clostridium histolyticum* (Brison, Milhade, 1951, Delaunay, Guillaume, Delaunay 1949). Natomiast wszystkie grzyby wegetujące na skórze powodują ubytek tłuszczów, glikozy i taniny, co z kolei wywołuje zwiększenie sztywności skóry i osłabienie powierzchni ziarnistej skóry.

Najprostszą metodą zapobiegania wzrostowi grzybów jest utrzymanie niewielkiej wilgotności w otaczającej atmosferze (50 - 60% wilgotności względnej), odpowiednie wietrzenie i stosunkowo niska temperatura. Warunki takie nie zawsze są osiągalne, dlatego potrzebne są środki zabezpieczające obiekty ze skóry i pergaminu przed atakiem mikroorganizmów.

PRACE WŁASNE

Pierwszym etapem naszej pracy było wyodrębnienie mikroorganizmów niszczących oprawy ze skóry w naszych warunkach klimatycznych, a następnie próby zwalczania tych organizmów środkami chemicznymi oraz zabezpieczanie skóry. Wyodrębnienie mikroorganizmów przeprowadzono w następujący sposób: Próbki skóry oprawowej zmywano wodą destylowaną i umieszczano na płytkach Petriego na podłożu agarowym lub żwirze po dwie w ten sposób, aby jedna leżała liczkiem (stroną ziarnistą), druga mizdrą (stroną mięsną) do powierzchni podłóż. Stosowaliśmy 4 typy podłóż (Kowalik, Sadurska 1954): 1) agar z wodą destylowaną, 2) agar z azotem mineralnym, 3) agar Czapek-Doxa z glikozą, 4) żwir zmyty z wodą destylowaną.

Na agarze Czapek-Doxa i agarze z azotem mineralnym grzyby wyrastały na ogół po 1 - 7 dniach, a na agarze z wodą i żwirze nieco później (Day 1949). Agar z wodą i żwir wydają się nam bardziej odpowiednie, ponieważ utrzymują skórę w stanie wilgotnym, a mikroorganizmy czerpią składniki chemiczne jedynie ze skóry.

Dzięki tym metodom wyhodowano:

Penicillium przypominające *claviforme*. Raper i Thom (1949) nie podają biochemicznych cech tego gatunku. Wyodrębnione przez nas *Penicillium* wykorzystuje taninę i rozpuszcza żelatynę z wydzielaniem brązowego barwnika do podłoża.

Penicillium przypominające *spinulosum* (Raper i Thom 1949). Gatunek ten bardzo dobrze wykorzystuje taninę.

Scopulariopsis brevicaulis należy przypuszczalnie do *var. glabra* Thom, ponieważ jest jasno zabarwione, a konidia posiadają gładkie ściany. Gatunek ten rozkłada taninę.

Aspergillus niger. Kostin (1950) podaje, że organizm ten atakuje skóry garbowane garbnikami roślinnymi i chromem. Rośnie w dużym zasięgu *pH* (1,7 - 7,7) w temperaturze 35°. Wyodrębniony przez nas szczep niszczy taninę.

Poza tym wyodrębniono: *Rhizopus nigricans, Mucor* przypominający *racemosus, Epicoccum nigrum, Alternaria sp., Cladosporium herbarum* i *Trichoderma viride* (Kowalik 1952) oraz 3 gatunki *Penicillium* bliżej nieoznaczone (Kowalik, Sadurska 1954), *Aspergillus sp., Fusarium, Streptomyces coelicolor.*

Następnym etapem naszej pracy było przeprowadzanie prób zwalczania pleśni na skórze środkami chemicznymi i zapobieganie pleśnieniu oraz zabezpieczanie opraw przed wpływami atmosferycznymi.

Literatura podaje następujące środki grzybobójcze, jako szczególnie czynne przeciw mikroorganizmom wegetującym na skórze: p-nitrofenol, p-chloro-m-krezol, p-chloro-m-ksylenol, o-fenylofenol, trójchlorofenolan sodu, p-benzylofenol i pięciochlorofenol (Cordon, Rogers, Mann i Teitell, 1949, Grassmann i Stadler, 1953, Lollar 1954, Stather, Herfeld, 1953) oraz związki organortęciowe (Grassmann i Stadler 1953). Najsilniej działają organiczne połączenia rtęciowe. Przy stosowaniu tych związków należy brać pod uwagę działanie trujące rtęci w stosunku do człowieka oraz tworzenie siarczków, jak np. przy stosowaniu sublimatu (w wyższych dawkach), które mogą powodować ciemnienie skóry oprawowej. Warto wspomnieć, że niektóre związki organortęciowe (według Prendergasta cyt. Grassmann i Stadler, 1953) są zupełnie nie groźne dla ludzi; np. boran fenylo-rtęciowy dodawany jest jako środek konserwujący krew przy transfuzjach.

Z dotychczasowych danych literaturowych wynika, że do konserwacji opraw skórzanych najbardziej nadają się fenole (Innes 1950, Plenderleith 1945). Należy przy tym zaznaczyć, że wprowadzenie do cząsteczki fenolu chloru lub grupy nitrowej zwiększa toksyczność. Grünhagen, Wolf i Dunn (1951) podali w swej pracy teorię wyjaśniającą mechanizm działania fenoli, a mianowicie: fenol w dawkach śmiertelnych inaktywuje systemy enzymatyczne, w dawkach hamujących wzrost inaktywuje tylko oksydazy. Własności bakteriobójcze fenoli można wyjaśnić działaniem litycznym.

Zagadnienie działania środków grzybobójczych nie jest jeszcze dostatecznie rozwiązane. Należy przy tym pamiętać, że związki te nie są silnie związane z substancją skóry i mogą być wymywane po higienicznych zabiegach w bibliotekach.

Związki chemiczne stosowane do ochrony skóry oprawowej powinne odpowiadać następującym warunkom: a) powinne być czynne w ilości nieprzekraczającej 0,3 - 0,5%, b) nie mogą mieć szkodliwego wpływu na skórę i nie mogą być trujące przy wdychaniu, c) nie mogą ulatniać się i wypłukiwać zbyt szybko ze skóry przy zmianach pogody, d) nie powinne wywoływać korozji metalowych części opraw, e) nie mogą posiadać nieprzyjemnego zapachu, g) muszą być rozpuszczalne w olejach garbnikowych i rozpuszczalnikach normalnie stosowanych przy pracach ze skórą, f) nie barwić skór.

W naszych pracach uznano za słuszne przebadać dostępne i możliwie najlepsze dla celów ochrony opraw skórzanych środki chemiczne: p-chloro-m-krezol, p-nitrofenol i jego sól sodową, o-fenylo-fenol, p-chlorofenol

oraz sole sodowe obu tych związków. Poza tym sprawdzono działanie octanu fenylo-rtęciowego *.

Badanie środków grzybobójczych przeprowadzono według metody opisanej w naszej pracy (K o w a l i k 1952). Związki nierozpuszczalne w wodzie przeprowadzano w sól sodową, traktując je 1-procentowym NaOH, przy czym *pH* agaru i wyciągu skóry ulegało tylko minimalnej zmianie.

Stwierdzono, że p-chloro-m-krezol zwalcza na podłożach agarowych: *Rhizopus nigricans, Mucor* p. *racemosus, Penicillium claviforme, Aspergillus niger, Trichoderma viride, Streptomyces coelicolor* w stężeniu 0,01-procentowym. *P*-nitrofenol działa w stężeniu 0.03-procentowym na te same grzyby, jego sól sodowa działa bardzo słabo. O-fenylo-fenol, p-chloro-fenol i ich sole sodowe hamują wzrost grzybów w stężeniu 0,05-procentowym. Octan fenylo-rtęciowy działa grzybobójczo na badane mikroorganizmy w stężeniu 0,0005-procentowym, *Trichoderma* i *Streptomyces* są bardziej wrażliwe. Stężenie 0,0001-procentowe działa na nie zabójczo.

Niezależnie od tych doświadczeń sprawdzono działanie środków chemicznych w warunkach odpowiadających praktycznemu zastosowaniu. Badania przeprowadzono na oprawach ze skóry z XVIII i XIX wieku. Paski skóry traktowane środkiem grzybobójczym umieszczano w warunkach najbardziej przychylnych dla rozwoju mikroorganizmów (agar Czapek-Doxa i agar z wodą).

Przy badaniu skuteczności działania środków grzybobójczych bezpośrednio na skórze należało zwiększyć stężenie około 10 razy. Użyto p-nitrofenolu 0,25-procentowego, o-fenylo-fenolu 0,3-procentowego, p-chloro-m-krezolu 0,25-procentowego, octanu fenylo-rtęciowego 0,005-procentowego.

W celu zabezpieczania opraw skórzanych od wpływów atmosferycznych i ataku pleśni poczyniono próby powlekania opraw lakierem etylocelulozowym (B l o c k 1951) **. Jako środka grzybobójczego użyliśmy przy tym zabiegu 0,25-procentowego p-nitrofenolu lub 0,3-procentowego o-fenylo-fenolu, 0,25-procentowego p-chloro-m-krezolu albo 0,005-procentowego octanu fenylo-rtęciowego. Jakkolwiek literatura podaje użycie do tego celu anilidu kwasu salicylowego, to jednak w naszych próbach środek ten dodany do lakieru nie zwalczał mikroorganizmów. Poza tym środek grzybobójczy dodawaliśmy bezpośrednio do skóry, a nie do lakieru z uwagi na to, że tworzywa sztuczne są trudno atakowane przez mikroflorę (G r e a t h o u s e, W e s s e l, S h i r k, 1951).

Przeprowadziliśmy również próby natłuszczania skóry środkiem polecanym przez pracownię konserwatorską muzeum brytyjskiego (P l e n d e r l e i t h 1945), złożonym z olejku cedrowego (30 g), lanoliny (200 g), wosku pszczelego (15 g) i eteru naftowego o punkcie wrzenia 60 - 80° (300 g). Przed natłuszczeniem traktowaliśmy skórę środkiem grzybobójczym; 0.25-procentowy p-nitrofenol, 0,3-procentowy o-fenylo-fenol, 0,25-procentowy p-chloro-m-krezol i 0,005-procentowy octan fenylo-rtęciowy

* p-chloro-m-krezol pochodził z importu, pozostałe związki syntetyzowano w Instytucie Barwników i Półproduktów.

** Etylocelulozę przygotowała laboratoryjnie inż. I. Ostaszewska w Instytucie Tworzyw Sztucznych.

zabezpieczają całkowicie skórę przed atakiem mikroorganizmów. Działanie p-nitrofenolu i octanu fenylo-rtęciowego ilustrują Fot. 1 - 4, Tabl. X — po str. 280, 1 - 4, Tabl. XI — po str. 288. Stężenia hamujące wzrost mikroflory na agarze i bezpośrednio na skórze wszystkich badanych środków chemicznych ilustruje tabela I.

Tabela I

Stężenia środków grzybobójczych w % hamujące wzrost mikroorganizmów na agarze i bezpośrednio na skórze

Fungicidal concentrations of some antifungal substances when applied on the agar medium and directly on the leather

Środki grzybobójcze Fungicidal substance	Stężenie w % hamujące wzrost mikroorganizmów Per cent concentration inhibiting the growth of fungi	Stężenie w % hamujące wzrost mikroorganizmów bezpośrednio na skórze Per cent concentration inhibiting the growth of fungi directly on the leather		
		Skóra Leather	Skóra z lakierem etylocelulozowym Leather coated with ethylcellulosic lacquer	Skóra ze środkiem natłuszczającym Leather coated with lanoline mixture
p-nitrofenol	0,03	0,25	0,25	0.25
o-fenylo-fenol	0,05	0,3	0,3	0,3
p-chloro-m-krezol	0,01	0,25	0,25	0,25
Octan fenylo-rtęciowy	0,0005	0,005	0,005	0,005

Tablica XI

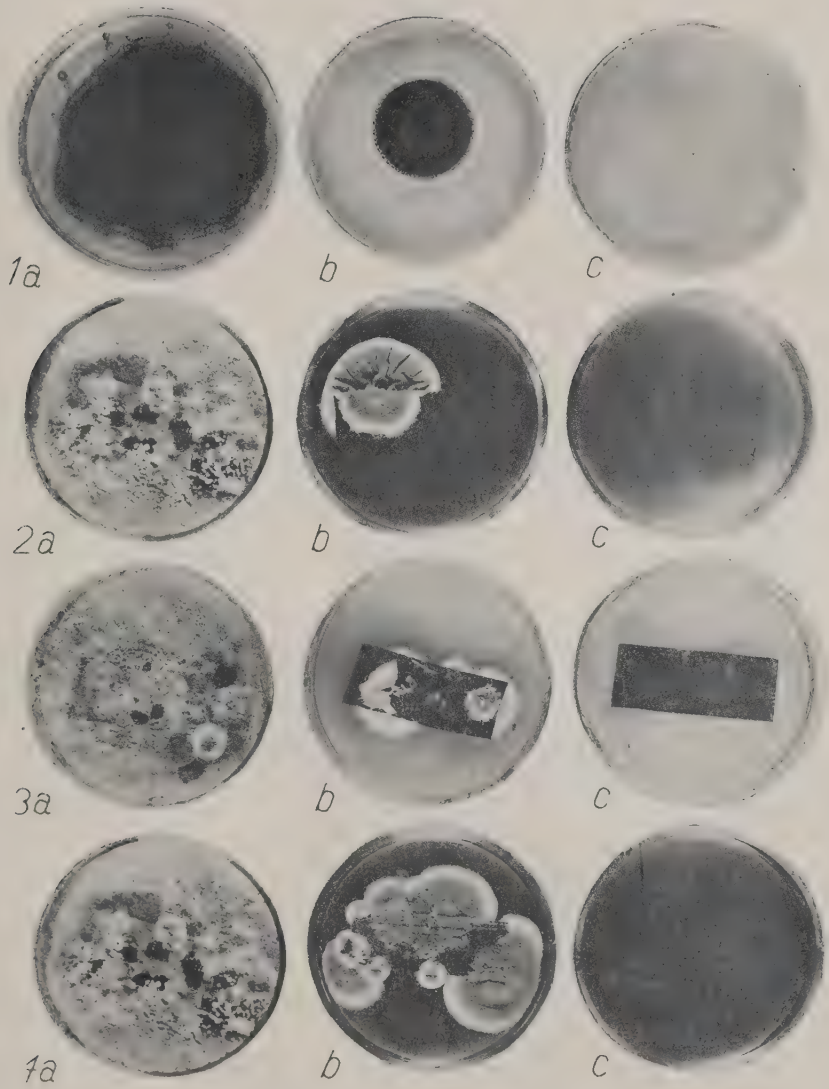
Do pracy: Kowalik i Sadurska, str. 285.

Fot. 1. Działanie octanu fenylo-rtęciowego na *Aspergillus niger* (hodowla na agarze): *a* — kontrola, *b* — stężenie 0,0001%, *c* — stężenie 0,0005%.
Działanie octanu fenylo-rtęciowego bezpośrednio na skórze:
Fot. 2. *a* — kontrola, *b* — stężenie 0,0025%, *c* — stężenie 0,005%.
Fot. 3. *a* — kontrola, *b* — lakier etylocelulozowy — 0,0025% octanu fenylo-rtęciowego, *c* — lakier etylocelulozowy — 0,005% octanu fenylo-rtęciowego.
Fot. 4. *a* — kontrola, *b* — środek natłuszczający — 0,0025% octanu fenylo-rtęciowego, *c* — środek natłuszczający — 0,005% octanu fenylo-rtęciowego.
(Pożywka Czapek-Doxa)

Table XI

To the paper by Kowalik and Sadurska, p. 285.

Phot. 1. The effect of phenylmercury acetat on *Aspergillus niger*. *a* — control, *b* — concentration 0,0001%, *c* — conc. 0,0005%.
The effect of phenylmercury acetat applied directly on the leather:
Phot. 2. *a* — control, *b* — concentration 0,0025%, *c* — conc. 0,005%.
Phot. 3. *a* — control, *b* — ethylcellulosic lacquer — phenylmercury acetate 0,0025%, *c* — ethylcellulosic lacquer — phenylmercury acetate — 0,005%.
Phot. 4. *a* — control, *b* — lanoline mixture — phenylmercury acetate 0.0025%, *c* — lanoline mixture — phenylmercury acetate 0,005%.
(All experiments performed on Czapek-Dox medium).


1a
b
c
2a
b
c
3a
b
c
1a
b
c

Tablica XII

Do pracy: Kowalik i Czerwińska, str. 291.

Wzrost grzybów na tkaninie wiskozowej impregnowanej:
1. 8-hydroksychinolinianem miedzi.
2. Dwumetylodwutiokarbaminianem cynku.
3. 8-hydroksychinolinianem cynku.

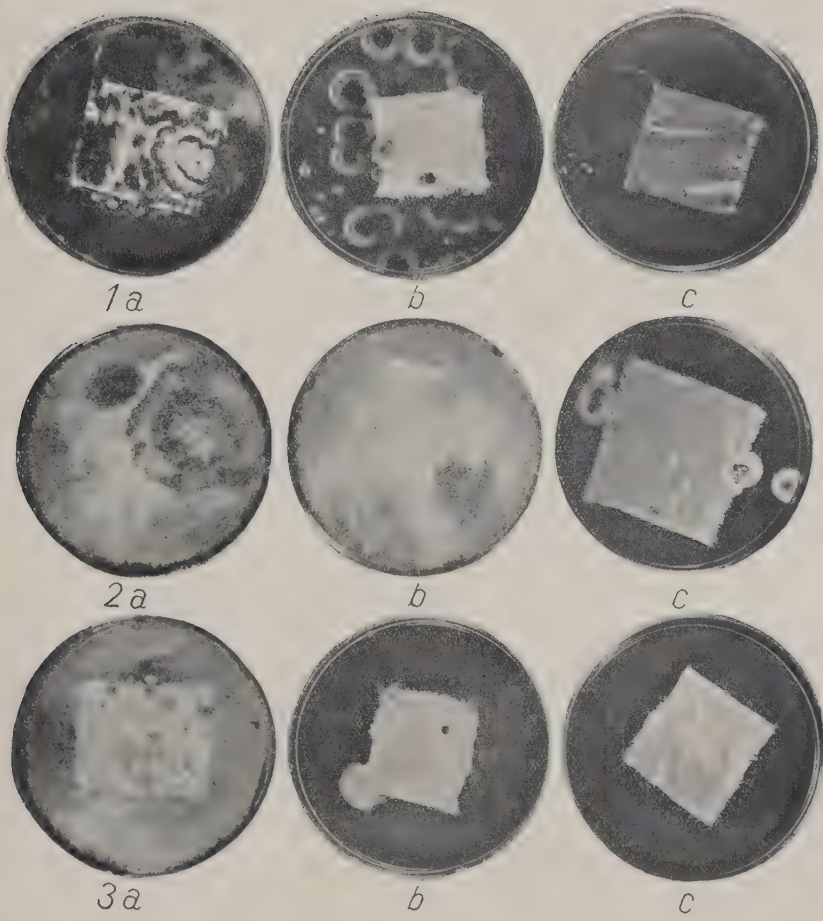
a — kontrolne, *b* — próbki prane, *c* — próbki nie prane.

Table XII

To the paper by Kowalik and Czerwińska, p. 291.

Growth of the fungi on viscose-textiles impregnated with:
1. Copper 8-quinolinolate.
2. Zinc dimethyl-dithiocarbamate.
3. Zinc 8-quinolinolate.

a — control samples, *b* — samples washed after impregnation, *c* — samples unwashed.


1a
b
c
2a
b
c
3a
b
c

Ze środków chemicznych w stanie gazowym sprawdzono również działanie grzybobójcze tlenku etylenu w mieszaninie z dwutlenkiem węgla (10 : 90) (Kirk i Othmer, 1954) w komorze próżniowej do dezynsekcji księgozbiorów. Stwierdziliśmy, że gaz ten działał grzybobójczo na wszystkie wyodrębnione ze skóry mikroorganizmy.

ZAKOŃCZENIE

Na podstawie danych z literatury i badań własnych można wysunąć następujące wnioski do wykorzystania w praktyce konserwatorskiej:

1. Należy utrzymywać odpowiednie warunki wilgotności w bibliotekach, archiwach i muzeach (wilgotność 50 - 60% wilgotności względnej, temperatura 14 - 18°).
2. Przy wystawianiu obiektów ze skóry i pergaminu w gablotach należy umieszczać wewnętrz gablot małe naczynia z wodą destylowaną, jałową.
3. Ze względu na zdolność skóry do absorbowania z atmosfery dwutlenku siarki i stopniowego kumulowania kwasu siarkowego (Hausam 1953), skóry należy pokrywać środkami ochronnymi regulującymi kwasowość, np. pirofosforan sodu (Innes 1950).
4. W celu uniknięcia ataku grzybowego, do skór można stosować następujące środki grzybobójcze: np. p-nitrofenol, o-fenylo-fenol, p-chloro-m-krezol, ewentualnie octan fenylo-rtęciowy.
5. Dla zabezpieczenia skóry przed zanieczyszczeniami z powietrza i atakiem grzybowym należy skórę potraktowaną środkiem grzybobójczym powlekać lakierem etylocelulozowym.
6. W przypadku kruszenia i łuszczenia skóry oprawowej należy, po potraktowaniu skóry środkiem grzybobójczym, stosować środek natłuszczający, złożony z lanoliny, olejku cedrowego, wosku pszczelego i eteru naftowego.
7. Przy pracach związanych z konserwacją opraw skórzanych należy zachować bezwzględnie podstawowe przepisy higieniczne.

LITERATURA

1. Block S. S., 1951: Protection of paper and textile products from insect damage. *Ind. Eng. Chem.*, **43**: 1558.
2. Brison J., Milhade J., 1951: A propos des collagénases. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**: 64.
3. Cordon T. C., Rogers J. S., Mann C. W., Teitell L., 1949: Protection of Army Ordnance leather equipment from molds. *J. Amer. Leather Chem. Assoc.*, **44**: 472.
4. Day D. A., 1949: A method of growing fungi on leather., *J. Amer. Leather Chem. Assoc.*, **44**: 558.
5. Delaunay M., Guillaume M., Delaunay A., 1949: Étude sur les collágene II. Nouvelles recherches sur les collagenases bacteriennes. *Ann. Pasteur.*, **77**: 220.
6. Grassmann W., Stadler P., 1953: Zur Frage der Schimmelbekämpfung auf Leder. *Das Leder*, **4**: 103.
7. Greathouse G. A., Wessel C. J., Shirk H. G., 1951: Microbiological deterioration of manufactured materials. *Ann. Rev. Microb.*, **5**: 333.

8. Gruenhagen R. H., Wolf P. A., Dunn E. E., 1951: Phenolic fungicides in agriculture and industry. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **16**: 349.
9. Hausam W., 1953: Über Konservierungsfragen. *Das Leder*, **4**: 25.
10. Innes E., 1950: The preservation of bookbinding leathers. *The Libr. Assoc. Record*, **52**: 458.
11. Kirk R. E., Othmer D. F., 1954: Encyclopedia of chemical technology 12, 904 Interscience Encyclopedia New-York.
12. Kostin N. P., 1950: Obszczaja tiechnołogija koži, Gizlegprom, Moskwa.
13. Kowalik R., 1952: Mikroorganizmy niszczące papier zabytkowy. *Prace Placówek Nauk.-bad. Min. Przem. Chem.*,: 2.
14. Kowalik R., Sadurska I., 1954: Ochrona skórzanych opraw książkowych. *Biuletyn Konserwatorski*, **1**: 11.
15. Lollar R. M., 1954: Para-nitrophenol as a fungicide for leather. *J. Amer. Leather Chem. Assoc.*, **49**: 605.
16. Plenderleith H. J., 1945: The preservation of leather bookbindings. Oxford, British Museum.
17. Raper K. B., Thom C., 1949: A manual of the Penicillia. Williams and Wilkins. Baltimore.
18. Stather F., Herfeld H., 1953: Vergleichende Untersuchungen über Geeignetheit verschiedener antiseptischer Mittel für die Rohhautkonservierung, Ledererzeugung und Lederlagerung., *Gesamm. Abhandl. Deutschen Lederinstitutes Freiberg/Sa*, **9**: 22.
19. Wiederhorn N. M., Reardon G. V., 1952: Structure of collagen II. Stress.-strain behaviour of thermally contracted collagen., *J. Polymer Sci.*, **9**: 315.
20. Woodroffe D., 1948: Fundamentals of leather science. Croydon, 1948, Harvey.

R. Kowalik and *J. Sadurska*

MICROORGANISMS DESTROYING LEATHER BOOKBINDINGS

Summary

The effectiveness of some antiseptics for control of the fungi (*Rhizopus, Mucor, Penicillium claviforme, Aspergillus niger, Trichoderma viride* and *Streptomyces coelicolor*) isolated from leather bookbindings were determined.

It was showed that p-chlor-m-cresol was effective at a concentration 0,01%, p-nitrophenol at 0,03%, o-phenyl-phenol, p-chlor-phenol and their Na salts at 0,05% on the agar media. Phenyl-mercury acetate was effective against *Trichoderma* and *Streptomyces* at a concentration 0,0001%, against the rest of fungi at 0,0005%.

In the experiments performed directly on the leather it was determined that p-nitrophenol, o-phenyl-phenol, p-chlor-m-cresol and phenyl-mercury acetate acted fungicidal at concentrations — 0,25%, 0,3%, 0,25% and 0,005% respectively. These substances should be applied before the coating of the leather with ethylcellulosic lacquer and before the dressing of leather with the mixture of lanolin, cedarwood oil, beeswax and hexane (or petroleum ether).

The mixture of ethylene oxide and carbon dioxide (10 : 90) in a vacuum chamber was shown to be fungicidal for all investigated fungi.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 291—297

R. Kowalik i *E. Czerwińska*

MIKROORGANIZMY NISZCZĄCE TKANINY BAWEŁNIANE I WEŁNIANE

Z Laboratorium Mikrobiologicznego Instytutu Barwników i Półproduktów w Warszawie

Dane statystyczne zebrane przez Korna (cyt. Siu, 1951) z okresu pierwszej wojny światowej wskazują na olbrzymi udział mikroorganizmów w niszczeniu tkanin bawełnianych.

Basu (1948), Basu i Ghose (1952), Block (1953), Das, Mitra, Wareham (1953), Greathouse, Wessel, Shirk (1951), Imszeniecki (1953), Krainsky (1914), Marsh, Bollenbacher, Butler, Raper (1949), Marsh, Guthrie, Butler (1951), Maurice (1955) Siu (1951), Siu, Sinden (1951), Thaysen, Bunker, Butlin, Williams (1939), Wegener, Questel (1953) wymieniają w swych pracach organizmy niszcząc błonnik i materiały pomocnicze w tkaninach i papierze oraz podają wpływ warunków zewnętrznych: wilgoci, *pH*, temperatury itd. na rozwój tych organizmów.

Moore (1953) oraz White, Mandels, Siu (1950) uważają, że materiały wełniane są odporne na działanie czynników biologicznych. Odporność tę przypisują występowaniu wiązań cystynowych pomiędzy poszczególnymi łańcuchami włókienek keratyny.

White, Mandels i Siu (1950) przypisują wielu grzybom występującym na tkaninach wełnianych, a więc spokrewnionych z materiałem keratynowym (włosami, paznokciami, kopytami, rogami), działanie chorobotwórcze dla zwierząt i człowieka.

Jedną z metod zabezpieczania tkanin przed rozkładem mikrobiologicznym jest stosowanie środków grzybo- i bakteriobójczych. Według Kirka i Othmera (1954) w wielu przypadkach same barwniki są skutecznymi środkami grzybobójczymi. Należą do nich: tlenki cynku, miedzi, ołowiu i chromu. Bacon (1952), Benignus (1948), Cooke (1954), Mandels, Siu (1950), Marsh (1949), Mc Millan, Bose, Battacharrya (1953), Nopitsch (1950), Richards (1954), Smith (1947) i wielu innych wymienia szereg środków grzybobójczych organicznych stosowanych do ochrony tkanin.

PRACE WŁASNE

Celem naszej pracy było sprawdzenie przyczyn gnicia tkanin bawełnianych, juty i wełny oraz podanie sposobów zabezpieczania przed rozkładem mikrobiologicznym. Pracę tę podjęliśmy na wniosek Centralnego Instytutu Ochrony Pracy.

Do badań otrzymano następujące próbki: taśmę parcianą, drelich bawełniany trudno zapalny, drelich impregnowany żywicą mocznikowo-formaldehydową, tkaninę jutową, surówkę wiskozową, drelich, brezent harcerski oraz dwie próbki tkaniny wełnianej kwasoodpornej.

Dla wyodrębnienia szczepów niszczących wymienione tkaniny nastawiano hodowle według metody podanej w pracy Kowalika (1952) na 17 podłożach: Dubosa z azotanem sodu o *pH* 7 i *pH* 5, Fahraeus o *pH* 7,1, Greathouse'a o *pH* 5,6, Hutchinsona o *pH* 5,3 i *pH* 7, Mc Betha o *pH* 8,4, Omeljanskiego o *pH* 5,1, Rogersa o *pH* 5,5, Stappa i Bortelsa o *pH* 6,5 i *pH* 5,0, Van Itersona o *pH* 5,5 i *pH* 7,0. Winogradskiego o *pH* 7,1. w wodzie destylowanej i wodzie wodociągowej oraz w żelu krzemionkowym według Winogradskiego.

W momencie wystąpienia wzrostu przesiewano powstałe organizmy na podłoża, z których je wyodrębniono, a następnie oczyszczano je oraz identyfikowano. Przy użyciu wyżej wymienionych podłóż wyodrębniono szereg szczepów niszczących tkaniny pochodzenia roślinnego.

Z taśmy parcianej wyizolowano: *Chaetomium globosum, Chaetomium spirale, Chaetomium* przypuszczalnie *aterrimum, Chaetomium* przypominające *contortum, Chaetomium* prawdopodobnie *murorum, Chaetomium* z grupy *elatum, Chaetophoma sp., Trichoderma viride, Sepedonium sp., Stachybotrys atra, Botryotrichum atrogriseum, Trichocladium Harz, Alternaria sp., Stemphylium sp., Stysanus stemonitis.*

Z juty wyodrębniono: *Chaetomium globosum, Chaetomium* z grupy *indicum, Chaetomium* z grupy *elatum, Trichoderma viride, Aspergillus sp., Penicillium sp., Trichocladium sp., Stemphylium sp., Stysanus stemonitis.*

Z surówki wiskozowej: *Chaetomium globosum, Chaetomium* z grupy *elatum, Chaetomium* przypominające *murorum, Cephalosporium, Trichoderma viride, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Penicillium sp., Scopulariopsis brevicaulis, Stachybotrys atra, Memnoniella echinata, Alternaria polymorpha, Alternaria sp., Stemphylium sp., Humicola fusco-atra, Stysanus stemonitis, Fusarium sp., Graphium sp.*

Z drelichu: *Chaetomium globosum, Botryotrichum atrogriseum, Penicillium sp., Sepedonium, Stachybotrys atra, Gliomastix sp., Alternaria sp., Stemphylium sp., Stemphylium macrosporoideum, Stysanus stemonitis.*

Z brezentu harcerskiego: *Chaetomium globosum, Chaetomium* z grupy *elatum, Trichoderma viride, Aspergillus sp., Sepedonium, Penicillium sp., Memnoniella echinata, Gliomastix sp., Trichocladium Harz, Trichothecium roseum, Alternaria sp., Stemphylium macrosporoideum, Stysanus stemonitis.*

Na wszystkich tkaninach bardzo często występowały różne szczepy promieniowców. Poza wymienionymi szczepami wystąpiło szereg gatunków, których nie zidentyfikowano.

Ciekawym grzybem jest *Memnoniella echinata.* Jest to grzyb, który, według Siu (1951) i White, Yeager, Shotts (1949), występuje w krajach tropikalnych. Grzyb ten najlepiej rośnie w okolicach dżdżystych i zalesionych, natomiast w krajach o klimacie łagodnym występuje tylko sporadycznie. Jest to szczep atakujący czystą celulozę. Jak podają autorzy, występuje razem z *Gliomastix convulata, Stachybotrys atra* i *Chaetomium.*

Memnoniella echinata charakteryzuje się przeźroczystą grzybnią. Posiada proste konidiofory z przegrodami i brodawkami. Wielkość konidioforów wynosi 50 - 100 μ długości, 3 - 4 μ szerokości. Na końcach konidioforów znajdują się podstawki, jak u *Stachybotrys,* z konidiami ułożo-

nymi w nierozgałęzione łańcuszki. Wielkość konidii wynosi 5 μ (podano opis grzyba z uwagi na to, że nieopisano go w dotychczasowych pracach naszych, poza tym obecności tego szczepu nie zauważono w północno-wschodniej Europie na materiale celulozowym). W naszych warunkach grzyb ten wystąpił na 2 rodzajach tkanin: tkaninie wiskozowej z pożywką Stappa i Bortelsa (pożywka zasadowa) oraz na brezencie harcerskim z podłożem Greathouse o *pH* 5,4. *Memnoniella echinata* wystąpiła dwukrotnie w hodowli ze *Stysanus stemonitis*.

Na tkaninach wełnianych wystąpiły: *Cephalosporium*, *Botryotrichum atrogriseum*, gatunek podobny do *Sporotrichum*, *Chaetomium globosum*, gatunek zbliżony do *Phialophora*, *Scopulariopsis brevicaulis*, szereg promieniowców, *Paecilomyces varioti*, przypuszczalnie *Masoniella*, *Stemphylium macrosporoideum*, *Mucor*, *Rhizopus*. Należy zaznaczyć, że szereg tych szczepów opisano w literaturze jako chorobotwórcze.

Drugim etapem pracy było wykonanie prób zabezpieczania tkanin przed atakiem grzybów przez zastosowanie związków chemicznych działających grzybobójczo.

Z szeregu związków chemicznych, jakimi dysponował Zakład, użyto do badań bezpośrednio na tkaninach: sól miedziową i cynkową 8-hydroksychinoliny oraz dwumetylodwutiokarbaminian cynku. Sól miedziowa 8-hydroksychinoliny jest często cytowana jako dobry środek stosowany w przemyśle tekstylnym. Richards (1954) podaje, że sól miedziowa 8-hydroksychinoliny jako związek chelatowy jest bardzo trwała, a lotność jej jest praktycznie znikoma; nie działają na nią promienie ultrafioletowe i radioaktywne. Poza tym związek ten nie drażni skóry i nie powoduje alergii.

Przebadanie bezpośrednio na tkaninach soli cynkowej 8-hydroksychinoliny wydawało się nam celowe, gdyż związek ten przebadany na podłożu agarowym hamował całkowicie wzrost grzybów przy stężeniu 0,0001-procentowym.

Opierając się na wynikach, otrzymanych w doświadczeniach nad zabezpieczaniem papieru przy pomocy dwumetylodwutiokarbaminianu cynku, uważano za słuszne zbadanie działania tego związku również bezpośrednio na tkaninie.

Pochodnymi fenolu: o-fenylo-fenolem, p-chlorofenolem, jakkolwiek według naszych doświadczeń działającymi dość silnie grzybobójczo (dawki hamujące całkowicie wzrost grzybów wynoszą 0,05% i 0,005%), nie zajmowano się bliżej ze względu na ich drażniące działanie na skórę. Anilid kwasu salicylowego, który jest często cytowany w literaturze, zwłaszcza angielskiej, jako dobry środek do ochrony tkanin, w naszych badaniach przeprowadzonych na papierze okazał się środkiem stosunkowo słabym wobec tego nie poddawano go dalszym próbom.

Działanie grzybobójcze soli miedziowej i cynkowej 8-hydroksychinoliny zbadano bezpośrednio na tkaninie wiskozowej i drelichu metodą podaną przez Benignusa (1949), gdyż sól miedziowa 8-hydroksychinoliny rozpuszcza się jedynie w kwasie octowym lodowatym (poza olejami i żywicami syntetycznymi). Traktowanie próbek roztworem soli w kwasie octowym i wypłukiwanie kwasu wodą do reakcji obojętnej może obniżyć toksyczność soli miedziowej 8-hydroksychinoliny, na skutek ujemnego działania kwasu octowego na tkaninę i możliwość wypłukiwania środka grzybobójczego. Tkanina traktowana w ten sposób była odporna na niektóre grzyby (*Aspergillus*, *Penicillium*), rosły na niej natomiast *Trichoderma* i *Trichocladium* przy stężeniu 0,125-procentowym. Na próbkach traktowanych 0,5-procentową zawiesiną wodną soli miedziowej 8-hydroksychinoliny zahamowany był także wzrost *Penicillium* i *Asper-*

gillus, wzrost natomiast *Trichoderma* i *Trichocladium* odpowiadał prawie wzrostowi tych grzybów na płytkach kontrolnych.

Benignus (1949), jako jeden ze sposobów użycia soli miedziowej 8-hydroksychinoliny do impregnacji tkanin, podaje mieszaninę złożoną z 9,5 g soli miedziowej 8-hydroksychinoliny, 11,5 g zmodyfikowanej żywicy alkidowej i 19 g chlorowanych dwufenyli. Mieszaninę tę podgrzewa się na wałku rozgrzanym do 140°, aż do roztopienia się, po czym dodaje się amoniak (5,7 g). Amoniak reaguje z żywicą dając mydła amonowe. Mieszaninę tę rozprowadza się w 163,4 g oleju mineralnego, dodaje się 171 g wody i całość przepuszcza się przez młyn koloidowy. W naszych doświadczeniach jako oleju mineralnego użyliśmy oleju parafinowego, a zawiesinę przygotowaliśmy przez dokładne mieszanie składników w moździerzu porcelanowym. Próbki zaimpregnowane zawiesiną suszono, a następnie połowę z nich prano w gorącej wodzie z mydłem i suszono ponownie. W ten sposób przygotowane próbki umieszczano w płytkach Petriego z pożywką ziemniaczaną o *pH* 5. Połowę próbek pranych i nie pranych szczepiono organizmami wyizolowanymi z tkanin: *Penicillium sp., Aspergillus niger, Trichoderma viride* i *Trichocladium sp.* W rezultacie otrzymano następujące kombinacje: 1. tkanina prana zakażona, 2. tkanina nie prana zakażona, 3. tkanina prana nie zakażona, 4. tkanina nie prana nie zakażona.

Badania przy użyciu dwumetylodwutiokarbaminianu cynku przeprowadzono na tkaninach bawełnianych metodą podaną przez Baord, Evans, Jackson (1948), polegającą na nasyceniu tkaniny dwumetylodwutiokarbaminianem cynku rozpuszczonym w amoniaku i wodzie (1 część dwumetylodwutiokarbaminianu cynku rozpuszcza się na gorąco w 35 częściach amoniaku, następnie dodaje się 40 części wody. Roztwór ten rozpuszcza się w 350 częściach wody). Zaimpregnowane tkaniny suszono, a następnie postępowano analogicznie jak przy badaniu poprzednich związków. We wszystkich badaniach nastawiano próbki kontrolne, tzn. tkaniny nie traktowane żadnym związkiem chemicznym. Odporność drelichu impregnowanego żywicą mocznikowo-formaldehydową sprawdzano na stałym podłożu: agar z wyciągiem ziemniaczanym i glikozą.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że sól miedziowa i cynkowa 8-hydroksychinoliny * oraz dwumetylodwutiokarbaminian cynku ** mają podobną moc grzybobójczą. Nieco silniejszym związkiem jest sól miedziowa 8-hydroksychinoliny. Na próbkach nie pranych zakażonych, w przypadku użycia soli miedziowej 8-hydroksychinoliny zauważono wzrost tylko jednego szczepu, natomiast w przypadku użycia soli cynkowej 8-hydroksychinoliny wystąpił wzrost 3 szczepów. Na próbce traktowanej dwumetylo-dwutiokarbaminianem cynku, nie pranej i zakażonej, rósł tylko jeden szczep (Fot. 1 - 3, Tabl. XII — po str. 288).

Z próbek traktowanych związkami chemicznymi, pranych oraz zakażonych, najbardziej odporna była próbka traktowana solą miedziową 8-hydroksychinoliny. Najmniej odporna była próbka impregnowana dwumetylodwutiokarbaminianem cynku. Odporność tkanin traktowanych związkami chemicznymi, pranych i nie pranych oraz nie zakażonych, jest jednakowa. Przy użyciu wszystkich 3 związków na próbkach pranych wystąpił słaby wzrost grzybów, a na próbkach nie pranych po 10 dniach nie zauważono wzrostu (Fot. 1 - 3, Tabl. XII).

Wyraźne różnice w odporności tkanin pranych i zakażonych, traktowanych solami 8-hydroksychinoliny i karbaminianem, mogły powstać wskutek wypłukania karbaminianu cynku. Do impregnacji dwumetylodwutiokarbaminianem cynku nie dodawano żadnych środków uodparniających na wodę. W przypadku impregnacji tkanin solami 8-hydroksychinoliny większą odporność uzyskano przypuszczalnie przez dodanie do impregnatu żywicy alkidowej.

* Przygotowana przez doc. dr Ecksteina.
** Przygotowany przez inż. Marszyńską.

Na podłożach płynnych celulozowych drelich impregnowany przez Pawłowską żywicą mocznikowo-formaldehydową był odporny na atak grzybów. Silny natomiast wzrost wystąpił wtedy, gdy jako podłoża użyto stałej pożywki agarowej z wyciągiem z ziemniaka i glikozą.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wydaje się nam, że w naszych warunkach odpowiednim związkiem do impregnacji tkanin może być dwumetylodwutiokarbaminian cynku. Związek ten zabezpiecza tkaniny nie prane przed atakiem grzybów w takim samym stopniu jak 8-hydroksychinolinian miedzi. Pierwsze próby przeprowadzone wspólnie z Pawłowską z C.I.O.P. pozwalają wnioskować, że wypłukiwaniu dwumetylodwutiokarbaminianu cynku będzie można zapobiec przez dodanie do impregnatu środka uodparniającego na wodę. Próbka traktowana dwumetylodwutiokarbaminianem cynku i żywicą heksametylomelaminową była najbardziej odporna na atak grzybów. Według Maurice (1955), środki uodparniające na wodę należy stosować w ściśle określonej ilości, gdyż przekroczenie pewnej granicy może obniżyć moc grzybobójczą związku chemicznego. Należy podkreślić, że stosowanie dwumetylodwutiokarbaminianu cynku jest znacznie mniej skomplikowane, niż stosowanie pochodnych 8-hydroksychinoliny. Poza tym dwumetylodwutiokarbaminian cynku nie powoduje barwienia tkanin a próby na zginanie, samozrywalność, pękanie i przepuklenie, przeprowadzane na papierze traktowanym tym związkiem grzybobójczym, pozwalają wnioskować, że nie będzie on miał ujemnego wpływu na celulozę zawartą w tkaninach.

LITERATURA

1. Bacon K. D., 1952: Preserves textiles from microorganisms. *Rayon Synth. Fibers*: 113.
2. Basu S. N., 1948: Fungal decomposition of jute fibre and cellulose. I. A preliminary survey of commonly occurring species. II. The effect of some environmental factors., *J. Text. Inst.* **39**: 232.
3. Basu S. N., Ghose S. N., 1952: Fungal attack of jute fibre and cellulose. III. The decomposition of cellulose as influenced by its physical state and by associated substances., *J. Text. Inst.*, **43**: 278.
4. Basu S. N., Ghose S. N., 1952: Fungal decomposition of jute fibre and cellulose. IV. The action of some physical and chemical agencies on subsequent fungal decomposition of jute., *J. Text. Inst.*, **43**: 355.
5. Benignus P. G., 1948: Copper 8-quinolinolate, industrial preservative., *Ind. Eng. Chem.*, **8**: 1426.
6. Benignus P. G., 1949: Fungus proofing composition., U.S.Pat. 2476235.
7. Block S. S., 1953: Humidity requirements for mold growth. *J. Appl. Microbiol.*, **1**: 287.
8. Baord W., Evans E. G., Jackson J. R. F., 1948: Preservation of textile materials or paper against attack by biological agencies. *Natural, Synth. Fibers*, **5**: 5.
9. Cooke T. F., 1954: Resistance to microbiological deterioration of resin treated cellulosic fabrics., *Text. Res. J.*, **24**: 197.
10. Das D. B., Mitra M. K., Wareham J. F., 1953: Association of glucose, arabinose and xylose in jute. *Nature*, **171**: 613.
11. Furry M., Robinson H., Humfeld H., 1941: *Ind. Eng. Chem.*, **33**: 538.

12. Greathouse A. G., Wessel C. J., Shirk H. G., 1951: Microbiological deterioration of manufactured materials. *Ann. Rev. Microbiol.*, **5**: 333.
13. Imszeniecki A. A., 1953: Mikrobiołogija celułozy. Moskwa. Izd. Ak. Nauk.
14. Kirk R. E., Othmer D. F., 1954: Encyclopedia of chemical technology. Interscience Encyclopedia, New-York.
15. Kowalik R., 1952: Mikroorganizmy niszczące papier zabytkowy. *Prace Placówek Nauk.-bad. Min. Przem. Chem.*, **2**: 49.
16. Krainsky A., 1914: Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur., *Zentr. Bakter., II*, **41**: 649.
17. Mandels G. R., Siu R. G. H., 1950: Rapid assay for growth, determination of microbiological susceptibility and fungistatic activity. *J. Bact.*, **60**: 249.
18. Marsh P. B., 1949: Fabric mildew resistance tests with organisms tolerant toward copper and mercury. *Amer. Dyest. Reptr.*, **38**: 436.
19. Marsh P. B., Bollenbacher K., Butler M. L., Raper K., 1949: The fungi concerned in fiber deterioration. II. Their ability to decompose cellulose. *Text. Res. J.*, **19**: 463.
20. Marsh P. B., Guthrie L. R., Butler M. L., 1951: Influence of weathering and of microorganisms on the aqueous extract *pH* of cotton fiber. *Text. Res. J.*, **21**: 565.
21. Maurice P., 1955: Methods for the control of fungi. *Chem. Prod.*, **18**: 167, 213.
22. McMillan W. G., Bose R. G., Bhattacharya J. P., 1953: A note on a copper tolerant *Penicillium*. II. Its cellulolytic activity and effect on copper-proofed hessian. *Rev. Appl. Mycol.*, **32**: 204.
23. Moore W. R., 1953: The structure and properties of natural and allied fibres. *J. Soc. Dyers and Col.*, **69**: 149.
24. Nopitsch M., 1950: Ursache und Bekämpfung von Schimmelbefall auf Textilien. *Mell. Textilber.*, **31**: 182.
25. Richards T., 1954: Spoilage of industrial materials by microorganisms. *Nature*, **173**: 102.
26. Siu R. G. H., 1951: Microbial decomposition of cellulose. Reinhold Publ. Co. New-York.
27. Siu R. G. H., Sinden J. W., 1951: Effects of *pH*, temperature and mineral nutrition on cellulolytic fungi. *Amer. J. Bot.*, **38**: 284.
28. Smith G., 1947: An introduction to industrial mycology. E. Arnold Co, London.
29. Thaysen A. C., Bunker H. J., Butlin K. R., Williams L. H., 1939: *Ann. Applied Biol.*, **26**: 750.
30. Wegener W., Questel R., 1953: Mikrobielle Schädigung an Leinengarnen und Geweben. *Mell. Textilber.* **34**: 12, 100, 403.
31. White W. L., Mandels G. R., Siu R. G. H., 1950: Fungi in relation to the degradation of woolen fabrics. *Mycologia*, **42**: 199.
32. White W. L., Yeager C. C., Shotts H., 1949: History, distribution and economic significance of the cellulose-destroying fungus *Memnoniella echinata*. *Farlowia*, **3**: 399.

R. Kowalik and *E. Czerwińska*

MICROORGANISMS CONCERNED IN DECAYING COTTON AND WOOL FIBERS

Summary

Different *Fungi imperfecti* and actinomycetes from 5 sorts of cotton textiles were isolated and identified on cellulose culture media. *Memnoniella echinata*, according to some authors appearing only in a tropics, was also isolated among other fungi.

From 2 sorts of wool twelve strains were isolated. Some of them were described in a literature as microorganisms pathogenic for men and animals

The experiments were performed to protect textiles against microorganisms. It was found that copper salt is a little more effective fungicide than zinc salt of 8-quinolinolate and zinc dimethyldithiocarbamate.

The samples of textiles treated with urea-formaldehyde resin were not completely resistant to fungal attack.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1956, 5, 299—302

E. Czerwińska i *R. Kowalik*

PENICILLIA NISZCZĄCE PAPIER ZABYTKOWY

Z Laboratorium Mikrobiologicznego Instytutu Barwników i Półproduktów w Warszawie

Basu, Gohse (1952 a), Boneh (1954), Heyes, Holden (1932), Marsh, Bollenbacher, Butler, Raper (1949), Moncreiff (1951), Scales (1915), Siu (1951), Stewart, Crawford, Miller (1953) i inni wymieniają szereg gatunków z rodzaju *Penicillium*, które hydrolizują celulozę. Hardy (cyt. Chesters, 1951) i inni przypisują występowanie tych organizmów na tkaninach i papierze ich wzrostowi na materiałach pomocniczych (np. kleje), a nie na samej celulozie.

PRACE WŁASNE

Ze względu na dosyć częste występowanie organizmów z rodzaju *Penicillium* na papierze zabytkowym przeprowadzono szereg doświadczeń na 30 szczepach tego rodzaju.

Aby przeprowadzić próby w temperaturze optymalnej dla każdego szczepu sprawdzono zdolność wzrostu badanych organizmów w różnych temperaturach: 0°, 22°, 25°, 27°, 30°, 35°. Jako podłoża użyto agaru z wyciągiem ziemniaczanym i glikozą.

Dodając do pożywki Greathouse azotanu amonu, azotanu sodu, jednozasadowego fosforano amonu, siarczanu amonu i asparaginy przy różnym *pH* (od 3 do 8) sprawdzono zdolność badanych szczepów do wykorzystywania tych źródeł azotu oraz wpływ stężenia jonów wodorowych na wzrost poszczególnych szczepów przy użytym źródle azotu. W ten sam sposob przy *pH* 5 sprawdzono zdolność szczepów do wykorzystywania peptonu. Jak wynikało z naszych poprzednich doświadczeń (Czerwińska, Sadurska, Kozłowska 1953), stężenie jonów wodorowych w przypadku użycia peptonu nie miało decydującego wpływu na wzrost mikroorganizmów. Jako źródła węgla używano bibuły do sączenia. Badania własności proteolitycznych przeprowadzono na mleku i żelatynie.

Zdolność do wykorzystywania różnych źródeł węgla: arabinozy, ksylozy, glikozy, galaktozy, sacharozy, mannozy, maltozy, mannitolu, dulcytolu i glicerolu sprawdzono na pożywce z najlepszym źródłem azotu i przy optymalnym *pH*. W celu zbadania wpływu stężenia związków węglowych na wzrost poszczególnych szczepów przeprowadzono próby przy następujących stężeniach: 0.1, 0.5 i 1%. Wzrost na ksylozie sprawdzono tylko przy stężeniu 0,1%.

Własności diastatyczne sprawdzono na podłożu stałym złożonym z bulionu, 0,2% skrobi i 2% agaru.

Zdolność do rozkładu celulozy wykazano już podczas sprawdzania wzrostu przy różnych związkach azotowych, kiedy jako źródła węgla użyto bibuły do sączenia. Ilościowo-procentowy rozkład celulozy oznaczano dla 20 szczepów metodą podaną przez Gołębiowską (1947) oraz Greathouse, Klemme i Barker (1942). Zaprzestano jednak dalszego oznaczania ze względu na trudności usuwania grzybni z bibuły. Na podstawie użytych metod można było tylko uzyskać orientacyjne dane.

Ze względu na prowadzoną dezynsekcję akt w komorze próżniowej za pomocą tlenku etylenu i dwutlenku węgla (10 : 90) zbadano wpływ tej mieszaniny gazów

na badane szczepy. W tym celu wyhodowane na paskach bibuły organizmy przenoszono do jałowych probówek zatykanych korkami z waty i umieszczano w komorze próżniowej. Po uzyskaniu praktycznie całkowitej próżni napełniano komorę mieszaniną gazów (do ciśnienia atmosferycznego). Hodowle poddawano działaniu gazu przez 4 godziny zachowując takie warunki, jak podczas dezynsekcji. Po przeprowadzeniu dezynsekcji hodowle przeszczepiano na pożywkę agarową z wyciągiem ziemniaczanym i glikozą i obserwowano je w ciągu 10 dni.

W końcowym etapie poczyniono próby identyfikacji badanych szczepów. W tym celu opierając się na podręczniku Rapera i Thoma (1949) oraz Zaleskiego (1928) hodowano organizmy na podłożu Czapka, dokonywano pomiarów oraz wykonywano zdjęcia mikrohodowli na tym samym podłożu.

WYNIKI BADAŃ

Optymalna temperatura dla badanych szczepów leży w granicach 25 - 30°. W temperaturze 35 - 36° obserwowano dobry wzrost tylko u jednego szczepu. 20 szczepów wykazywało słaby wzrost i brak owocowania. Dla 9 szczepów temperatura 35 - 36° była zabójcza. W temperaturze poniżej 0° 15 szczepów wykazywało słaby wzrost. Basu (1948) podaje, że 30° było optymalną temperaturą dla rozkładu celulozy przez *P. islandicum*.

Jak wynika z naszych doświadczeń, szczepy z rodzaju *Penicillium* są zdolne do wykorzystywania wszystkich źródeł azotu przy odpowiednim *pH*. Dla większości szczepów najodpowiedniejszym źródłem azotu był azotan amonu. Pepton i asparagina były średnio wykorzystywane przez badane szczepy. Należy zaznaczyć, że w przypadku użycia peptonu i asparaginy wzrost występował na powierzchni płynu a nie na bibule.

Na 30 szczepów z rodzaju *Penicillium* 20 szczepów hydrolizowało żelatynę w czasie od 4 dni do 3 tygodni, a 18 szczepów peptonizowało mleko.

Z badań nad zdolnością szczepów do wykorzystywania różnych źródeł węgla wynika, że sacharoza, mannoza, maltoza, glicerol i galaktoza są odpowiedniejszymi źródłami węgla aniżeli arabinoza, dulcytol i mannitol. Jeden szczep nie wykorzystywał arabinozy i jeden sacharozy. *Penicillium vermiculatum* owocowało na wszystkich podłożach przy stężeniu 0,5- i 0,1-procentowym, natomiast przy stężeniu cukru 1% występował tylko silny wzrost. W przypadku występowania barwy, intensywność zabarwienia podłoża zależała od stężenia źródła węgla; najsłabsze zabarwienie występowało na ogół przy stężeniu 0,1%.

Na 30 szczepów użytych do badań, 10 szczepów hydrolizowało skrobię całkowicie, 9 szczepów częściowo, a 11 szczepów nie posiadało własności diastatycznych. Intensywność rozkładu błonnika przez badane szczepy leży w granicach 2 - 24%, w zależności od szczepu.

Na 30 szczepów poddanych działaniu tlenku etylenu i dwutlenku węgla w stosunku 10 : 90, po przesianiu na stałą pożywkę wyrósł tylko jeden szczep.

Obserwacje wzrostu na podłożu Czapka, przeprowadzone badania biochemiczne oraz obserwacje mikroskopowe nie były wystarczające do zidentyfikowania badanych szczepów, dlatego pracę tę traktujemy jako nie zakończoną.

Na podstawie otrzymanych wyników wydaje nam się, że 8 szczepów należy do: *Penicillium implicatum, P. vermiculatum, P. notatum, P. brevicompactum, P. clavigerum, P. funiculosum, P. Thomi* (2 szczepy), *P. cyclopium, P. stoloniferum*.

ZAKOŃCZENIE

Jak wynika z naszych doświadczeń, *Penicillium* jest zdolne do wykorzystywania prawie wszystkich badanych źródeł węgla i azotu.

Ze względu na to, że do klejenia papierów używano klejów pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a do apretury przy produkcji papieru używano siarczanu baru i wapnia, oraz z uwagi na to, że wzrost *Penicillium* może nastąpić przy zawartości wody nie większej niż 7,8% (Beckwith, Swanson, Iams 1940), grzyb ten stanowi duże niebezpieczeństwo dla archiwaliów i innych materiałów celulozowych, nawet wtedy, gdy nie jest zdolny do hydrolizowania błonnika.

Penicillium, rosnąc na produktach pomocniczych, powoduje wydzielanie wody, a tym samym zwiększenie wilgoci w papierze, która może być przyczyną ataku grzybów rozkładających celulozę.

Basu (1948) za optymalne *pH* dla rozkładu celulozy przez grzyby uważa *pH* 5,8 lub niższe. Według niego intensywność rozkładu celulozy zmniejsza się, gdy *pH* podnosi się powyżej 5,8.

Według naszych doświadczeń optymalne *pH* jest ściśle związane ze źródłem azotu. Na podłożach z azotanem sodu wartość optymalnego stężenia jonów wodorowych będzie niższa niż na podłożu z siarczanem lub fosforanem amonu.

Jak wynika z naszych doświadczeń, prawie wszystkie *Penicillium* były zdolne do wykorzystywania arabinozy i ksylozy, która może stanowić, szczególnie w papierach gorszej jakości, węglowe źródło pożywienia.

Na podstawie orientacyjnych wyników intensywności niszczenia błonnika byłoby wskazane przeprowadzenie tych badań metodą bardziej dokładną, którąby pozwoliła wykazać ilościowy udział rodzaju *Penicillium* w rozkładzie celulozy.

W związku z uzyskanymi wynikami działania grzybobójczego tlenku etylenu na *Penicillium* należy przeprowadzić próby na organizmach z innych grup systematycznych. Na podstawie danych Frobishera (cytowanych przez Kirk, Othmera, 1954), dotyczących jałowienia podłóż przy pomocy tlenku etylenu, oraz naszych badań można przypuszczać, że mieszaninę tlenku etylenu i dwutlenku węgla (10 : 90) będzie można zastosować do dezynfekcji akt. Metoda ta chociaż nie zabezpiecza trwale eksponatów przed dalszym atakiem grzybów, niszczy jednak doraźnie pleśnie rozwijające się na eksponatach oraz nie pozwala na rozprzestrzenianie się zarodników grzybów. Dlatego też przed czyszczeniem i dezynfekcją archiwaliów roztworem eterowo-benzenowym tymolu i sublimatu należałoby poddać materiały działaniu tlenku etylenu i dwutlenku węgla w komorze próżniowej.

LITERATURA

1. Basu S. N., 1948: Fungal decomposition of jute fibre and cellulose. I. A preliminary survey of commonly occurring species II. The effect of some environmental factors. *J. Text. Inst.*, **39**: 232.
2. Basu S. N., Ghose S. N., 1952 a: Fungal attack of jute fibre and cellulose. III. The decomposition of cellulose as influenced by its physical state and by associated substances. *J. Text. Inst.*, **43**: 278.
3. Basu S. N., Ghose S. N., 1952 b: Fungal decomposition of jute fibre and cellulose. IV. The action of some physical and chemical agencies on subsequent fungal decomposition of jute. *J. Text. Inst.*, **43**: 355.

4. Beckwith T. D., Swanson W. H., Iams T. M., 1940: Deterioration of paper. The cause and effect of foxing. University of California Press, Berkeley, California.
5. Boneh Shira, 1954: Contribution to the knowledge of some textile fungi in Israel. *Rev. Appl. Mycol.*, **33**: 546.
6. Chesters C. G. C., 1951: Mildews of textiles and related materials. *Research*, **4**: 102.
7. Czerwińska E., Sadurska I., Kozłowska D., 1953: Promieniowce niszczące papier zabytkowy. *Acta Microbiol. Polon.*, **2**: 160.
8. Gołębiowska J., 1947: Przyczynek do badań nad rozkładem błonnika przez grzyby niższe występujące w glebie. *Ann. Univ. Maria Curie Skłodowska*, 2: 9.
9. Greathouse G. A., Klemme D. F., Barker H. D., 1942: Determining the deterioration of cellulose by fungi. *Ind. Eng. Chem.*, **14**: 614.
10. Heyes T. P., Holden H. S., 1932: Investigation of the action of certain species of *Penicillium* on artificial silk. *J. Text. Inst.*, **23**: 79.
11. Kirk R. E., Othmer D. F., 1954: Encyclopedia of chemical technology. Insterscience Encyclopedia, New-York.
12. Marsh P. B., Bolienbacher K., Butler M. L., Raper K., 1949: The fungi concerned in fiber deterioration. II. Their ability to decompose cellulose. *Text. Res. J.*, **19**: 463.
13. Moncreiff R. W., 1951: Research into rotting of textile fibers. *Silk and Rayon Rec.*, **25**: 1.
14. Raper K. B., Thom C., 1949: A manual of the *Penicillia*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
15. Scales F. M., 1915: Some filamentous fungi tested for cellulose destroying power., *Bot. Gaz.*, **60**: 149.
16. Siu R. G. H., 1951: Microbial decomposition of cellulose. Reinhold Publ. Corp., New-York.
17. Stewart W. D., Crawford R. A., Miller H. A., 1953: Defibering of ground rubber scrap with cellulose-decomposing fungi. *India Rubber World*, **127**: 794.
18. Zaleski K., 1928: Über die in Polen gefundenen Arten der Gruppe *Penicillium* Link., I, II und III Teil. *Bull. Acad. Polon. Sci. Math. Nat. Ser. B*: 417.

E. Czerwińska and *R. Kowalik*

PENICILLIA DESTROYING ARCHIVAL PAPERS

Summary

Thirty isolated strains of *Penicillium* were able to use the following N sources: $NaNO_3$, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$. 20 strains hydrolyzed gelatine, 18 peptonized milk.

Penicillia tested, were growing well on media with the following substances as an only source of carbon: arabinose, xylose, glucose, galactose, saccharose, mannose, maltose, mannitol and glicerol. Some strains were able to grow only slowly on arabinose, xylose, dulcitol and mannitol.

10 strains completely, 9 partly hydrolyzed starch. All strains decomposed cellulose (2 - 24% during 3 weeks).

Ethylene oxide and carbon dioxide (10 : 90) in a vacuum chamber acted fungicidal with one exception against all strains isolated.

All experiments were conducted at the temperature 25 - 30°, optimal for these strains. Growth of 15 strains was observed even at 0°.

J. Snaglewska

ZDROŻDŻOWANIE WYWARU PO FERMENTACJI ACETONOWO-BUTANOLOWEJ
THE UTILISATION OF MASH AFTER ACETONE-BUTYLIC FERMENTATION FOR PRODUCTION OF FODDER YEASTS

Z Zakładu Utylizacji Wód Ściekowych Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie

Analiza chemiczna wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej, wykazująca około 2,5% suchej pozostałości, z czego 75% stanowią rozpuszczone związki organiczne oraz znaczne ilości azotu, fosforu i substancji redukujących, skierowała tok prac prowadzonych nad oczyszczaniem wywaru w kierunku jego wykorzystania jako surowca do produkcji drożdży paszowych.

Próby zdrożdżowania wywaru przeprowadzono przy pomocy czterech ras drożdży, z których dwa szczepy należały do rodzaju *Candida*, a dwa szczepy do rodzaju *Torulopsis*, oraz na jednym szczepie *Oospora lactis*, wyizolowanym z wywaru butanolowego.

Optimum stężenia jonów wodorowych dla rozwoju badanych kultur drożdżowych znajdowało się w granicach *pH* 5,0 - 6,0. Dla otrzymania odpowiedniej wydajności masy drożdżowej o zawartości białka 50 - 55% konieczny był dodatek do wywaru soli amonowych w ilości 1 g/l oraz soli fosforowych w ilości 0,3 g/l wywaru.

Prowadzono fermentacje 12-godzinne oraz półciągłe 26-godzinne.

Średnie wydajności badanych kultur drożdżowych wahały się w granicach od 3 do 4 g suchej masy drożdżowej z 1 litra wywaru. Nie stwierdzono większych wahań w wydajności badanych ras drożdży hodowanych na wywarze butanolowym.

A. Jankun

WYOSOBNIENIE I ZBADANIE SZCZEPU DROŻDŻY „BRUSZNICA 7"
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ШТАММА ДРОЖЖЕЙ „BRUSZNICA 7"

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Krakowie

Przy zastosowaniu soku brusznicowego w przemyśle winiarskim napotyka się na trudności w przeprowadzeniu fermentacji. Zawarty w tym soku kwas benzoesowy hamuje funkcje życiowe drożdży.

W celu sprawdzenia, czy drożdże występujące na brusznicy są bardziej odporne na kwas benzoesowy od ras drożdży dotychczas stosowanych w przemyśle, wyizolowano czyste kultury drożdży z mikroflory żyjącej na jagodach brusznicy (*Vaccinium vitis idaea* L).

Z wyosobnionych szczepów drożdży, o cechach morfologicznych i fizjologicznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus* (H) D., najsilniejszy okazał się szczep *Brusznica* 7. W przeprowadzonych próbach na skalę laboratoryjną i na skalę techniczną szczep ten dał szybsze i wyższe odfermentowanie od najlepszych ras drożdży winiarskich zaszczepionych w równoległych nastawach kontrolnych.

Dostosowanie do środowiska drożdży *Brusznica* 7 zaznaczyło się szczególnie w łatwym zafermentowaniu moszczów brusznicowych.

B. Łachecka

DROŻDŻE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*, JAKO ZAKAŻENIE MOSZCZÓW OWOCOWYCH - SIARKOWANYCH

ДРОЖЖИ *SCHISOSACCHAROMYCES POMBE* ЗАРАЖАЮЩИЕ ФРУКТОВЫЕ СУСЛА, ОБРАБОТАННЫЕ SO_2

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej w Łodzi

W kilku partiach siarkowanego moszczu jabłkowego, moszczu z głogu oraz w matce drożdżowej rozmnożonej na moszczu jeżynowym, pochodzących z Łódzkiej Wytwórni Win, stwierdzono występowanie drożdży rozszczepkowych obok komórek typu *Saccharomyces cerevisiae*. Wyodrębnione czyste kultury drożdży odpowiadały cechom morfologicznym i fizjologicznym *Schizosaccharomyces pombe*.

3 szczepy wybrane do badań wykazały dużą odporność na zawartość SO_2 w moszczu, dając rozwój z objawami żywej fermentacji alkoholowej przy zawartości początkowej 582 mg w litrze SO_2 wolnego, a 1178 mg związanego.

Drogą pasażowania przystosowano te szczepy do wyższych stężeń pyrosiarczynu potasu, otrzymując rozwój przy dawkach odpowiadających 3000 mg SO_2 w litrze moszczu jabłkowego.

Przeprowadzono fermentację porównawczą ze szczepem *Sch. pombe* z kolekcji berlińskiej i z drożdżami winiarskimi typ Syrena, używanymi do fermentacji moszczów siarkowanych przy produkcji win.

Próby fermentacyjne na moszczu jabłkowym wykazały prawidłowy przebieg fermentacji alkoholowej; stwierdzono przy tym różnicę u szczepów adaptowanych i nieadaptowanych do SO_2.

Badania nad metabolizmem drożdży i ich przydatnością przemysłową są kontynuowane.

J. Jakubowska, H. Oberman i *A. Nowakowska*

MIKROBIOLOGICZNE BADANIA KAZEINY WŁÓKIENNICZEJ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕКСТИЛЬНОГО КАЗЕИНА

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej w Łodzi

W okresie 1954 i 1955 roku przebadano 35 próbek kazeiny różnego pochodzenia z partii przerabianych na włókna białkowe, w tym 12 kazein I gatunku, 16 II gatunku oraz 27 doświadczalnych. Stwierdzono, że według obowiązujących norm mogą w produkcji okazać się wadliwe zarówno kazeiny I jak i II gatunku.

Ustalono metodykę badań na podłożach selektywnych. Nie stwierdzono zasadniczych różnic dla kazein I i II gatunku. Natomiast stwierdzono różnice ilościowe i jakościowe w mikroflorze pozwalające podzielić kazeiny na typy:

1. Kazeiny świeże, o licznej mikroflorze (kilkaset do około 30 000 komórek w 1 g, z przewagą bakterii fermentacji mlekowej, które nie powodują zaburzeń w produkcji).

2. Kazeiny przechowywane, słabiej zakażone, ale o podwyższonej zawartości bakterii proteolitycznych i kazeolitycznych, drożdży lub pleśni (kilkadziesiąt do kilku tysięcy komórek w 1 g).

Zmiany jakościowe mikroflory szczególnie wyraźnie stwierdzono w kazeinie magazynowanej w fabryce w ciągu 16 miesięcy.

Badania ilościowe i jakościowe wiskozy (13 próbek) wykazywały w 1 g obecność od 100 (głównie przetrwalnikowce) do 5 milionów komórek bakteryjnych.

W wiskozach wadliwych w produkcji występowały prawie wyłącznie tlenowce i beztlenowce przetrwalnikujące. Uzupełniająco oznaczano w kazeinach: azot ogólny, rozpuszczalny i aminowy.

Badania nad działaniem barwników i środków dezynfekcyjnych w kazeiniarniach i w fabryce włókien sztucznych są kontynuowane.

S. Stawicki i *K. Zodrow*

BADANIA NAD MIKROFLORĄ MĄCZKI ZIEMNIACZANEJ

ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОФЛОРЫ КАРТОФЕЛЬНОЙ МУКИ

Z Centralnej Inspekcji Standaryzacji w Poznaniu

Badano eksportowy gatunek mączki ziemniaczanej, wodę używaną do jej produkcji oraz materiał pochodzący z różnych etapów procesu technologicznego. W mączce ziemniaczanej określano ilość występujących w niej bakterii, przetrwalników oraz grzybów. Badania wykonano metodą probówkową i płytkową, z uwzględnieniem bakterii psychrofilnych, mezofilnych oraz termofilnych. Szczególną uwagę zwrócono na obecność pałeczek z grupy *Escherichia-Aerobacter*, jako głównego wskaźnika stanu higienicznego mączki. Wodę używaną do produkcji badano na ogólną ilość bakterii, jak również oznaczano jej miano *coli*. Ponadto mączkę, wodę oraz inny materiał badano także na obecność pałeczek z grupy *Salmonella* i *Shigella*.

Zbadano 165 próbek mączki i stwierdzono, że w ilości 0,1 g znajduje się średnio 250 bakterii psychrofilnych, 103 bakterii mezofilnych, 109 bakterii termofilnych oraz około 80 przetrwalników bakterii. Większość badanych prób mączki wykazywała obecność pałeczek z grupy *Escherichia-Aerobacter*. Z grzybów stwierdzono w mączce obecność gatunków z rodzaju *Mucor*, *Rhizopus*, *Torula*, *Cladosporium*, *Chromatosporium* oraz drożdżaki. Zbadano również 40 próbek wody, które w większości przypadków wykazały miano *coli* od 0,1 do 0,01. Praca omawia związek między stanem mikrobiologicznym wody używanej do produkcji, a obecnością drobnoustrojów w mączce oraz podaje projekt norm standardu bakteriologicznego dla tego produktu.

K. Kluczycki

STANDARDOWE KULTURY GRZYBÓW DRZEWNYCH DO BADANIA WARTOŚCI GRZYBOBÓJCZEJ I GRZYBOCHRONNEJ

СТАНДАРТНЫЕ КУЛЬТУРЫ ДОМОВЫХ ГРИБОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНГИЦИДНЫХ И ФУНГИСТАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗНЫХ ВЕЩЕСТВ

Z Katedry Technologii Ścieków Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Z rozwojem naszego przemysłu budowlanego i zastosowaniem w technice tworzyw pochodzenia organicznego, istnieje w Polsce coraz pilniejsza potrzeba jednoznacznego i porównywalnego oznaczania tzw. wartości grzybobójczej środków impregnacyjnych dla tych tworzyw (np. drewna), lub wartości grzybochronnej samych tworzyw (np. hydroizolacji asfaltowych itp.). Zagadnienia powyższe wchodzą ogólnie w zakres tzw. korozji biologicznej.

Stosowana tu np. metoda konwencyjna używa do tych oznaczeń kilku szczepów typowych grzybów drzewnych (domowych) o znanej, wielokrotnie i wszechstronnie przebadanej odporności na poszczególne rodzaje środków toksycznych. Szczepy te dają wyniki porównywalne na całym świecie.

W Polsce do powyższych badań nie stosowano dotąd kultur standardowych, stąd niemożność ich porównywania oraz chaos w wykorzystaniu tych wyników. Z inicjatywy autora zostały sprowadzone za pośrednictwem II Wydziału PAN odpowiednie kultury grzybów drzewnych z NRD.

J. Jakubowska

WYODRĘBNIANIE I DIAGNOSTYKA BAKTERII CZYNNYCH W TWORNIKU OCTOWYM

ВЫДЕЛЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА АКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ УКСУСА

Z Zakładu Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej w Łodzi

Celem pracy było opanowanie metody wyodrębniania czystych kultur bakterii fermentacji octowej, czynnych w procesie octowania tzw. metodą szybką. Materiał do badań pobierano z czynnego, poprawnie pracującego generatora Fringsa w octowni łódzkiej w okresie 20/XI - 16/XII 1952 roku.

Ze świeżo pobranych wiórów zmywano bakterie, zawiesinę posiewano na powierzchnię płytki agarowej (brzeczka z etanolem). 5-krotne wysiewy pobieranego w różnym okresie szarży materiału dały szybki i jednolity wzrost tego samego typu kolonii pałeczek fermentacji octowej. Próby nagromadzenia dawały wyniki negatywne wobec złego wzrostu tego typu bakterii w warunkach laboratoryjnych na pożywce płynnej. Drogą kilkakrotnego pasażowania otrzymano czyste kultury, które w hodowli wstępnej wykazywały cechy właściwe *Acetobacter Schützenbachii* lub *curvum* (Henneberg), a odpowiadały typowi *Mesoxydans* (Frateur).

Morfologia i fizjologia drobnoustrojów — Морфология и физиология микроорганизмов — Morphology and physiology of microorganisms

1. A. Horoszewicz i J. Horoszewicz: Obserwacje nad wpływem penicyliny i innych antybiotyków na postacie *L Proteus mirabilis*
Observations on the influence of penicillin and other antibiotics upon *L* forms of *Proteus mirabilis* 9

2. Z. Kwiatkowski, W. Kunicki-Goldfinger i Z. Lorkiewicz: Niektóre własności fizjologiczne pałeczki odmieńca pospolitego w stadium *L*
Some physiological characteristics of the *L* forms of *Proteus vulgaris* . . 15

3. A. Sander, M. Tabaczyński i Z. Kwiatkowski: Typologia form *L* u *Proteus vulgaris*
Typology of *L* forms — *Proteus vulgaris* 21

4. Z. Lorkiewicz, B. Marciniak i I. Żelazna: Wpływ niektórych czynników na powstawanie form *L*
Factors influencing the transformation of *Proteus vulgaris* into *L* forms 27

5. W. Kunicki-Goldfinger, K. Dygdała, M. Łagowska i D. Wiercieńska: Wpływ chlorku litu na *Escherichia coli* i niektóre inne bakterie
The effect of LiCl on some bacteria, especially *Escherichia coli* . . . 33

6. W. Kunicki-Goldfinger, K. Dygdała, M. Łagowska i D. Wiercieńska: Formy gonidialne bakterii
Gonidial forms of bacteria 41

7. J. Parnas: Próby doświadczalnego przeobrażenia cech odmian pałeczek *Brucella*
Попытки экспериментального преображения свойств палочек *Brucella* 45

8. H. Meisel i P. Trembowler: Analiza własności biochemicznych, serologicznych i toksynotwórczych szczepów *Clostridium Sordelli* z uwzględnieniem zmienności
Биохимические, серологические и токсиногенные свойства *Clostridium Sordelli* и их изменчивость 51

9. J. Meduski, I. Małachowska i A. Linde: Badania nad wpływem warunków hodowli na przebieg czynności enzymatycznych u *Escherichia coli*
Studies on the influence of growth condition upon enzymatic activities of *Escherichia coli* 53

10. M. Piechowska: Isolation of the enzyme rosponsible for keratolysis
Wyosobnienie enzymu powodującego keratolizę 57

11. W. Tysarowski, S. Kwiek i B. Migdalska: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoopornych. II. Wpływ oksy- i methemoglobiny na oddychanie *Myc. phlei* oraz *M. tuberculosis*, szczep *C.*
The behaviour of the haemoproteins in the presence of acidfast bacilli. II. Influence of oxyhaemoglobin as well as methaemoglobin on the respiration of virulent strain and saprophytic strain *M. phlei* 65

12. W. Tysarowski i S. Kwiek: Zachowanie się hemoprotein w obecności prątków kwasoopornych. III. Redukcja methemoglobiny przez zawiesiny prątków gruźlicy
The behaviour of haemoproteins in the presence of acidfast bacilli. III. Reduction of methemoglobin in suspensions of tubercle bacilli . . . 69

13. J. Meduski, A. Zbrożyna, A. Zakrzewska i D. Olkowska: Badania nad fosfolipazą *C Clostridium perfringens*. Lecytyna wodorowana jako substrat fosfolipazy *C* w środowisku wodnym
Studies on the phospholipase *C* of *Clostridium perfringens* type *A*. Saturated lecithins as substrate of phospholipase *C* in an aqueous medium 73

14. H. Meisel i H. Albrycht: Wpływ glikozy, *pH* i żelaza na powstawanie lecytynazy w hodowlach pałeczek z grupy *perfringens*
Влияние глюкозы и железа на продукцию липазы культурами палочек из группы *perfringens* 77

15. H. Meisel i D. Rymkiewicz: Antygenowe właściwości zarodników wytwarzanych przez laseczki tężca.
Антигенные свойства спор микробов столбняка 79

16. Z. Szynkiewicz: Płynna wzbogacająca pożywka z żółtkiem jaja kurzego do hodowli włoskowców różycy
Liquid egg-yolk-culture medium for *Erysipelothrix rhusiopathiae* . . . 81

17. Z. Szynkiewicz: Czynnik wzrostowy dla włoskowców różycy, zawarty w esktraktach alkoholowych i acetonowych żółtka jaja kurzego
Growth factor for *Erysipelothrix rhusiopathiae* in ethanol- and chloroform-extracts of egg-yolk 85

18. Z. Szynkiewicz: Próby ekonomicznego wykorzystania mięsa odpadkowego do przygotowania bulionu
More economical utilisation of meat in the production of broth-culture-media for bacteria 89

19. S. Kałużewski: Badania nad odczynem fosfatazowym u różnych gatunków drobnoustrojów
Studies on the phosphatase test in various species of microorganisms 95

Krótkie streszczenia — Авторефераты — Short notes

20. A. Ber i L. Dryzek: O czynnikach wzrostowych dla *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzanych przez *Penicillium*
О ростовых факторах *Saccharomyces cerevisiae*, образованных *Penicillium* 99

21. A. Ber i J. Zieleniewski: Wpływ antybiotyków na regenerację. I. Wpływ penicyliny białej krystalicznej i dwuhydrostreptomycyny na regenerację kończyn u żab *Xenopus laevis* Daudin
Влияние антибиотиков на регенерацию: I. Влияние белого кристаллического пенициллина и дигидрострептомицина на регенерацию конечностей у лягушек *Xenopus laevis* Daudin 99

22. A. Ber i J. Zieleniewski: Wpływ penicyliny żółtej i białej, dwuhydrostreptomycyny i wyciągów wodnych z suszu grzybni pofermentacyjnej *Penicillium chysogenum Q-176* na wzrost i rozwój kijanek *Xenopus laevis* Daudin
Влияние желтого и белого пенициллина, дигидрострептомицина и водных экстрактов сухого послеферментационного мицелия *Penicillium chrysogenum Q-176* на рост и развитие головастиков *Xenopus laevis* Daudin 100

23. J. Baranowska i D. Shugar: Rola białek w metodyce i w lokalizacji barwienia Gramem drobnoustrojów
The significance of proteins in the methods and localisation of gram-staining in microorganisms 100

24. A. Jarmolińska i D. Shugar: Barwienie i działanie różnych enzymów na bakterie termofilne żywe i zabite wysoką temperaturą

Influence of various enzymes on the thermophilic bacteria, living and killed with high temperature, and on their staining 101

25. G. Bagdasarian: Metoda badania metabolizmu ogólnego drobnoustrojów

Метод исследования общего метаболизма микроорганизмов. . . . 102

26. G. Bagdasarian, K. Michalska, A. Odrzywolska i J. Łyczewska; Badanie podłoży bakteryjnych i standaryzacja zawiesin za pomocą metody oksytropii

Исследования бактерийной среды и нормировка взвесей методом окситропии. 102

27. G. Bagdasarian, K. Michalska i A. Odrzywolska: Badania nad współczynnikiem ekonomicznym i szybkością zużycia substratów przez drobnoustroje metodą oksytropii

Исследования экономического коэффициента и скорости расхода исходных продуктов среды микроорганизмами методом окситропии. . . 103

28. G. Bagdasarian i A. Odrzywolska: Zastosowanie metody badania oksytropii substratów bakteryjnych dla obserwacji wpływu antybiotyków

Применение метода исследования окситропии бактерийных исходных продуктов для наблюдения влияния антибиотиков 103

29. B. Janota: Powiązanie anabolizmu z katabolizmem u *Pseudomonas extorquens* Bassalik

Взаимосвязь анаболизма и катаболизма у *Pseudomonas extorquens* Bassalik 104

30. G. Bagdasarian, D. Hulanicka, H. Kleczkowska, T. Kłopotowski i A. Wiaterowa: Badania nad przemianą materii maczugowców błonicy. Doniesienie I

Studies on some metabolic processes in *Corynebacterium diphteriae* I 104

31. E. Janczura i J. Piasecka-Aleksandrowicz: Wykorzystanie siarki i kwasu glutaminowego przez szczep *PW8* maczugowca błonicy

The assimilation of sulphur and glutamic acid by *Corynebacterium diphteriae PW8* 105

32. O. Sakławska-Szymonowa i E. Gąsior: Transaminazy u *Mycobacterii*

Трансаминазы у микобактерий 105

33. H. Kurzepa: *Acetobacter xylinum* jako ilościowy wskaźnik kwasu pantotenowego

Acetobacter xylinum в качестве количественного индикатора пантотеновой кислоты 106

Mikrobiologia gleby, wody, powietrza i ścieków — Микробиология почвы, воды, воздуха и сточных вод — Microbiology of soil, water, air and sewage

34. J. Sobieszczański: Aparat do badań nad wpływem drobnoustrojów na odżywianie się roślin

Аппарат для исследования влияния микроорганизмов на корневое питание растений 109

35. J. Duda: Zastosowanie metody głębinowej w hodowli azotobaktera

The application of submerged cultures for growing of *Azotobacter* 113

36. T. Wróbel: A search of a rapid method for determining the activity of strains the root-nodule bacteria
Poszukiwanie szybkich metod określania aktywności szczepionek bakteryjnych dla roślin motylkowych 117

37. T. Wróbel i J. Gołębiowska: Инокуляция бобовых растений клубеньковыми бактериями на разных почвах
Szczepienie bakteriami brodawkowymi roślin motylkowych na różnych typach gleb 121

39. J. Gołębiowska: A method of investigation of the microbial population playing a part in the transformation of phosphorus compounds in the soil
Metoda badania zespołów mikroflory glebowej czynnej przy przemianach związków fosforowych w glebie 125

40. A. Nowotny-Mieczyńska i J. Gołębiowska: The influence of microbial population on the phosphorus uptake by some crop plants
Wpływ mikroflory na pobieranie fosforu przez rośliny uprawne . . . 129

41. B. Smyk i A. Miłkowska: Wpływ promieni podczerwonych na dezynfekcję ziarna siewnego
The influence of infra-red rays on the desinfection of grains 133

42. J. Gołębiowska i T. Wróbel: Distribution of antagonistic actinomycetes in different soils
Występowanie promieniowców antagonistycznych w różnych glebach . . 137

43. A. Luchterowa i E. Markiel: Wpływ gazu ziemnego na rozwój bakterii metanowych w glebie
The influence of natural gas upon the growth of bacteria utilizing methane in soil 141

44. T. Lityński, H. Jurkowska i D. Pieniak: Wpływ fluoru na kropidlaka (*Aspergillus niger*)
tions of soil microflora of mountain pastures 147

45. B. Smyk i A. Miłkowska: Wpływ nawożenia mineralnego w połączeniu z koszarzeniem na zespoły mikroflory gleb pastwisk górskich.
The influence of mineral fertilizers and enclosure of animals upon associations of soil microflora of mountain pastures 165

46. J. Paluch, S. Radecka, M. Zdybiewska i J. Filipowicz: Charakterystyka mikrobiologiczna wody zbiornika rzecznego w Kozłowej Górze przeznaczonego dla celów wodociągowych
Die mikrobiologische Charakteristik des Flusswasserbehälters für Wasserleitungszwecke in Kozłowa Góra 173

47. J. Paluch i R. Dobrzański: Próby określenia dynamiki przemiany materii w wodzie powierzchniowego zbiornika wodnego w Kozłowej Górze. II. Dobowe zmiany zawartości tlenu, biochemicznego zapotrzebowania tlenu, dwutlenku węgla, stężenia jonów wodorowych oraz ilości bakterii i planktonu
Versuche zur Bestimmung der Stoffwechseldynamik im Wasser des Oberflächenbeckens von Kozłowa Góra. II. Tageswechsel des Sauerstoffs, biochemischen Sauerstoffbedarfes, Kohlendioxyds, der Wasserstoffionenkonzentration, sowie der Keimzahl und des Planktons 181

48. J. Paluch, S. Radecka i J. Filipowicz: Stan sanitarny górnego biegu Wisły i jej dopływów oraz terenu zalewu w Goczałkowicach
Der Sanitätszustand des Oberlaufes der Wisła und ihrer Nebenflüsse, sowie das zuüberflutenden Gebieten bei Goczałkowice 187

49. J. Paluch i A. Szymkiewicz: Stan bakteriologiczny źródlisk rzeki Wisły na zboczach Baraniej Góry
Der bakteriologische Sanitätszustand des Wisłaquellgebietes an den Abhängen der Barania Góra 197

50. W. Macander: Badania nad prątkami kwasoopornymi występującymi w wodzie rzecznej, do której wpływają ścieki po przejściu przez oczyszczalnię
Исследование кислотоустойчивых бактерий в речной воде, куда сплывают очищенные сточные воды 201

51. N. Balicka i J. Sobieszczański: Żywotność *Escherichia coli* w glebie nawadnianej ściekami miejskimi
Выживаемость *B. coli* в почве, орошаемой сточными водами . . . 207

Krótkie streszczenia — Авторефераты — Short notes

52. M. Możejko: Rozkład alkaloidów przez mikroorganizmy glebowe
Разложение алкалоидов почвенными микробами 211

53. A. Joszt i J. Gańczarczyk: Odbudowa kwasów ligninosulfonowych w tlenowych warunkach rzeki
Decomposition of lignosulfonic acids in aerobic conditions of a river . . 211

54. A. Joszt, J. Gańczarczyk i B. Taniewska: Odbudowa kwasów ligninosulfonowych metodą osadu czynnego
Decomposition of lignosulfonic acids by means of activated sludge . . 213

55. K. Kluczycki: Znaczenie doboru biocenoz swoistych dla oczyszczania ścieków przemysłowych
Значение выбора специфических биоценозов для очистки промышленных сточных вод. 214

Mikrobiologia przemysłowa i środków spożywczych — Техническая и пищевая микробиология — Industrial microbiology and microbiology of food

56. I. Januszewicz: Biosynteza dekstranu przez różne szczepy *Leuconostoc mesenteroides*
Biosynthesis of dextran by different strains of *Leuconostoc mesenteroides* 217

57. J. Kovats: Die Bakteriophagen in der Aceton-Butylalkohol-Fermentation
Bakteriofagi w fermentacji acetono-butanolowej 225

58. E. Kocwa: Wpływ penicyliny na wytwarzanie acetonu przez *Clostridium acetobutylicum*
Влияние пенициллина на образование ацетона *Clostridium acetobutylicum* 231

59. J. Snaglewska: Oczyszczanie wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej na drodze fermentacji beztlenowej
Anaerobic treatment of slops from the acetone-butanol fermentation . . 235

60. M. Dłużewski: Charakterystyka drożdży wywołujących fermentację syropów owocowych i stężonego soku gronowego
Characteristics of the yeasts causing the fermentation of fruit sirups and concentrated grape juice 241

61. M. Burbianka: Właściwości antygenowe „enterotoksyny" — czynnika toksycznego występującego w hodowlach gronkowców
The antigenic properties of enterotoxin — a toxic agent appearing in staphylococcal cultures 245

62. A. Pliszka: Bezpośrednie oznaczanie gronkowcowego czynnika toksycznego w wyciągach z żywności
The direct determination of staphylococcal toxic agent in food extracts 253

63. T. Jakubczyk: Studia nad zastosowaniem próby reduktazowej do warzyw i produktów warzywnych
On the application of the reductase test for vegetables and vegetable products 259

64. A. Horubała: Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych do usuwania drobnoustrojów z surowców owocowych i warzywnych
The use of the surface active agents for removing microorganisms from surface of fruits and vegetables 263

65. W. Moycho i W. Gromska: Antagonizm występujący w mleku między *Streptococcus lactis* a *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas fluorescens*
Antagonistic action of *Streptococcus lactis* against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*, observed in milk 267

66. E. Lipińska: Mikrobiologiczne metody zapobiegania wadom sera wywoływanym przez bakterie kwasu masłowego
Microbiological methods of control of the butyric acid fermentation in chees 271

67. R. Kowalik i I. Sadurska: Mikroflora niszcząca papier, skórę i pieczęcie woskowe, występująca w powietrzu magazynów archiwalnych
Microorganisms destroying paper, leather and wax seals in the air of archives 277

68. R. Kowalik i I. Sadurska: Mikroorganizmy niszczące oprawy książkowe ze skóry
Microorganisms destroying leather bookbindings 285

69. R. Kowalik i E. Czerwińska: Mikroorganizmy niszczące tkaniny bawełniane i wełniane
Microorganisms concerned in decaying cotton and wool fibers 291

70. E. Czerwińska i R. Kowalik: Penicillia niszczące papier zabytkowy
Penicillia destroying archival papers 299

Krótkie streszczenia — Авторефераты — Short notes

71. J. Snaglewska: Zdrożdżowanie wywaru po fermentacji acetonowo-butanolowej
The utilisation of mash after acetone-butylic fermentation for production of fodder yeasts 303

72. A. Jankun: Wyosobnienie i zbadanie szczepu drożdży „Brusznica 7"
Выделение и исследование штамма дрожжей „Brusznica 7" . . . 303

73. B. Łachecka: Drożdże *Schizosaccharomyces pombe* jako zakażenia moszczów owocowych-siarkowanych
Дрожжи *Schizosaccharomyces pombe* заражающие фруктовые сусла обработанные SO_2 304

74. J. Jakubowska, H. Oberman i A. Nowakowska: Mikrobiologiczne badania kazeiny włókienniczej
Микробиологические исследования текстильного казеина 304

75. S. Stawicki i K. Zodrow: Badania nad mikroflorą mączki ziemniaczanej
Исследования микрофлоры картофельной муки 305

76. K. Kluczycki: Standardowe kultury grzybów drzewnych do badania wartości grzybobójczej i grzybochronnej
Стандартные культуры домовых грибов для исследования фунгицидных и фунгистатических свойств разных веществ 305

77. J. Jakubowska: Wyodrębnienie i diagnostyka bakterii czynnych w tworniku octowym
Выделение и диагностика активных бактерий в производстве уксуса 306

ERRATA

str.	wiersz	jest	powinno być
13	16 od góry	pojawienie się	pojawienia się
19	21 od dołu	characterictics	characteristics
87	12 od góry	różyny	różycy
89	7 od dołu	chałkowitego	całkowitego
186	9 od dołu	25-Studenzyklus	24-Stundenzyklus
272	8 od dołu	inhnbntion	inhibition
304	4 od góry	Schisosaccharomyces	Schizosaccharomyces

Acta Microbiologica Polonica, Vol. V, N° 1–2.

30.—
Cena zł[redacted]